

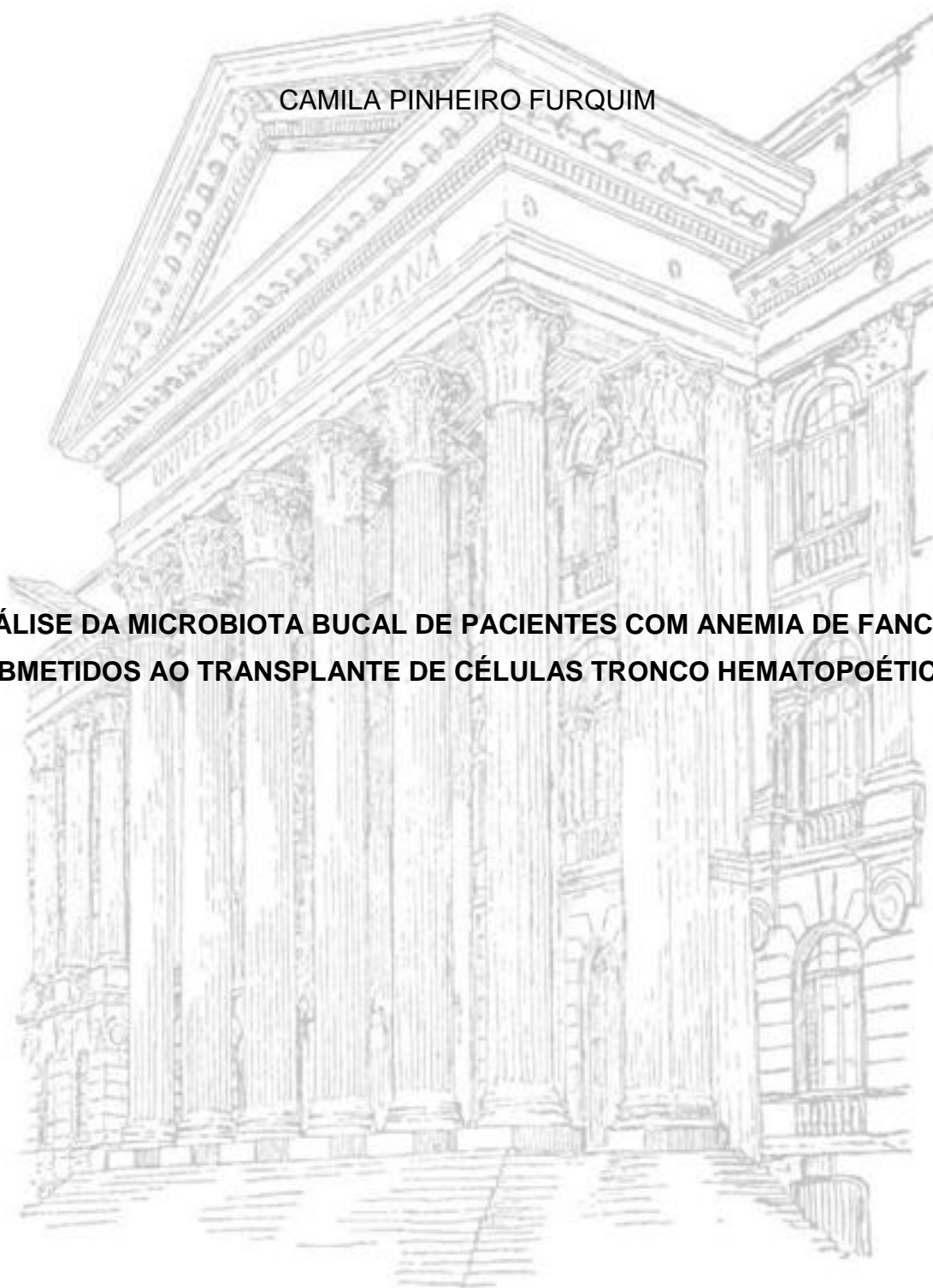
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA PINHEIRO FURQUIM

**ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS**

CURITIBA

2016



CAMILA PINHEIRO FURQUIM

**ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Odontologia. Departamento de Estomatologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira

CURITIBA

2016

Furquim, Camila Pinheiro

Análise da microbiota bucal de pacientes com anemia de Fanconi submetidos ao transplante de células tronco hematopoéticas / Camila Pinheiro Furquim - Curitiba, 2016.

100 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Anemia de Fanconi. 2. Neoplasias bucais. 3. Microbiota. 4. Saliva. 5. Bactérias. 6. Sequenciamento de nucleotídeos de alto rendimento. I. Torres-Pereira, Cassius Carvalho. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

CAMILA PINHEIRO FURQUIM

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS

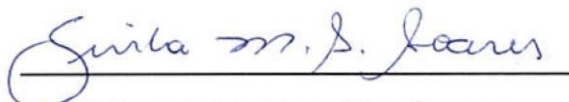
Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador:



Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR



Prof.ª. Dra. Geisla Mary Silva Soares

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR



Profa. Dra. Carmem Maria Sales Bonfim

Setor de Transplante de Medula Óssea -HC, UFPR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, meu porto seguro e minha maior fonte de motivação.

Dedico também a todos os pacientes com anemia de Fanconi e seus familiares, que me ensinaram que sempre vale a pena viver. Aprendi com eles que a doença nem sempre tem cura e que as perdas são inevitáveis, mas que o amor e a esperança são remédios importantes no alívio da dor.

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é um estado psicológico que nos permite conectar-se profundamente com os outros e com o mundo ao nosso redor”

(Daniela Esteves)

Agradeço primeiramente a DEUS, pelo dom da vida, por me dotar de sabedoria e curiosidade.

Aos familiares e amigos...

Ao meu pai Luiz Carlos que sempre foi firme comigo, não me deixando desistir, a minha mãe Cleusa que sempre me ouviu com muita paciência e sempre teve uma palavra doce e amiga nas horas de desconforto e a minha querida irmã Milene, tão sonhada por mim, agradeço toda a sua compreensão e por abrir mão de muitas coisas em favor dos meus estudos.

Aos meus avós Vicente e Ivone, Anísio e Teresinha, cada um com suas particularidades e qualidades que admiro muito. Em especial as minhas duas avós que nunca deixaram de rezar por mim e pedir a Deus que me cuidasse.

A todos os meus familiares; afinal a família é a energia que nos recarrega quando estamos fracos. Agradeço em especial a Ana, por sempre ser a minha “tia amiga” e por ter me dado os melhores presentes: João Pedro e Maria Clara os primos que fazem me sentir amada. Eles conservam viva a criança que existe dentro de mim.

Às minhas irmãs Cristina Berrocal Salazar e Marta Aparecida Alberton Nuernberg do famoso Trio's house, com elas vivi muitas aventuras, compartilhei histórias (cheias de detalhes), segredos e alegrias. Com a Martinha compartilhei muitos cafés filosóficos e com a Cris aprendi a ser mais livre.

À Cláudia Morales e a Kátia Inoue, pois juntas formamos a La casa Internacional. Quando achei que ficaria sozinha, vocês chegaram. Agradeço a Clau

por sempre compartilhar comigo as mais lindas histórias de fé. Sentirei saudades desse 102.

Às minhas amigas Denise Spinardi, Gabriela Schumacher, Priscila Schiroky e Rafaela Costa. Verdadeiros presentes que a UFPR me deu e que levo sempre comigo. Nem o tempo e a distância desfazem os laços de verdadeira amizade.

À minha dupla da faculdade, dupla de TCC, e dupla amiga de mestrado Allana Pivovar. Amiga que me conhece tão bem. Agradeço muito por ter a oportunidade de compartilhar os melhores momentos da minha vida com você.

À Aninha Jardim, por sua amizade doce e amável. O seu testemunho de vida e a força com que encara os problemas me motiva muito.

Às amigas do Encontro com Cristo que tornaram a caminhada mais leve e cheia de sentido. À Bianca por longas conversas e conselhos. Como cresci na vida e na fé com você e seu exemplo.

Aos amigos Marina Rodrigues, Francisco Barbosa, Giselda Leite, Jéssica Barasuol, Vitor Arima e Camila Turchenski. Alguns amigos separados por km, mas que de alguma maneira estiveram bem próximos por meio da amizade sincera. Sou muito grata ao Vitor e a Cami por terem contribuído com o meu projeto de vida mais saudável; descobri que andar de bicicleta é uma paixão.

À Laura, amiga que ama a ciência e os pacientes com anemia de Fanconi. Você contribuiu muito com a minha trajetória acadêmica. Compartilhamos muitas viagens de congressos, rimos e também choramos com as histórias de luta dos nossos pacientes.

À Ana Maristela, por ser mais que uma secretária de pós-graduação. Por ser também uma mãezona, amiga e por ter sempre um café quentinho e gostoso.

Aos meus amigos sonhadores da ONG Sonhar Acordado, que assim como eu acreditam que os valores humanos podem ser transmitidos e que as crianças podem fazer do mundo um lugar melhor.

A todos os outros amigos que Curitiba teve o prazer de me apresentar. Cada um para um momento especial, aqueles que dedicaram o seu tempo para falar inglês e espanhol, andar de bicicleta, admirar o pôr do sol, correr no parque, ir ao cinema e tomar uma cerveja, enfim, aqueles que se fizeram presentes nos mais simples detalhes e que deram cor a essa fase da minha vida.

Às instituições e pessoas que tornaram esse estudo possível...

À Universidade Federal do Paraná, instituição que há seis anos me acolhe e que tenho orgulho em fazer parte. Pretendo honrar seu nome por todos os lugares que passar e quem sabe um dia realizar o sonho de voltar para casa como professora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPR, por abrir as portas e ampliar meus horizontes. A todos os docentes, por acreditarem que é possível gerar ciência de qualidade em um país com recursos acadêmicos limitados. Aos professores que decidiram sair de sua zona de conforto e que aceitaram o desafio de dar um pouco mais de si pela educação e por honrar o nome da nossa universidade e de nosso curso centenário.

Ao Governo Federal, por meio da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo incentivo financeiro.

Ao Laboratório de Farmácia em nome do professor Roberto Pontarolo que forneceu materiais para a coleta de dados e armazenamento adequado de minhas amostras.

Ao laboratório de Biologia Bucal em nome do professor José Miguel, que não mediu esforços em fornecer materiais, preparar soluções, me ensinar técnicas laboratoriais e acima de tudo por acreditar na minha capacidade.

Ao PET e NEOTMO. Em especial a seu tutor que acredita no potencial do trabalho em grupo e sabe que é possível formar cirurgiões dentistas mais humanos e que realizam trabalhos de ensino, pesquisa e extensão. O PET foi o ponto de partida nessa trajetória de vida acadêmica, por isso nunca consegui me desligar de vocês.

A todos os alunos da graduação que estiveram envolvidos na minha formação de mestre. As tardes na estomatologia foram sempre de muito aprendizado. À Camila Maciel, Francielle Iachiskin, Jullyana Mayara, Junior Goetems, Nicole Perdoncini, Suelen Rodrigues e Victor Cordeiro, alunos da graduação, amigos que tive o prazer de orientar e que contribuíram com a minha formação docente.

À todas as pessoas que contribuíram com a execução prática da pesquisa, seria impossível realizar qualquer etapa sozinha. Não me atrevo a citar nomes, pois corro o risco de esquecer alguém, afinal a ajuda veio de todos os lados.

Aos professores da Estomatologia, funcionários e monitores. Professor Cleto Piazzetta um exemplo de professor e que muito me inspira. Professor José Miguel Amenabar, por sempre confiar na minha capacidade e também por ter despertado em mim o gosto pelo laboratório. Não é que você acertou?!. Professora Juliana Schussel com sua vontade de ensinar diferente e com alegria. Quero levar isso para os meus futuros alunos. Realmente sentirei muitas saudades dessa clínica e do maravilhoso convívio com vocês. Aí se encontram os tipos de profissionais que quero ser.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Em particular ao Ambulatório de Transplante de Medula Óssea. Foi aí que descobri a minha paixão dentro da odontologia. Aprendi a olhar o paciente em toda a sua complexidade.

A todos os médicos, enfermeiros, terapeutas ocupacionais e técnicos que fazem da sua profissão uma oferta de carinho aos pacientes. Em especial a Dra Carmem Bonfim por permitir o desenvolvimento da minha pesquisa, por demonstrar compromisso e amor ao seu trabalho.

Às minhas companheiras de Hospital. A dupla Aline Scottini e Carol Mazur as pioneiras da residência em odontologia UFPR. Sou grata por ter dividido esse espaço com vocês. Tenho um carinho muito especial por esse lugar e também pelos pacientes. Fico orgulhosa de saber que agora eles recebem um cuidado especial.

Aos pacientes com anemia de Fanconi, por compartilhar suas histórias, por me permitir fazer parte de suas vidas e por entender que a pesquisa nem sempre

traz resultados imediatos e diretos, mas que sua participação pode servir de inspiração para futuros avanços na ciência, melhorando a vida de pessoas que virão depois deles.

À Colgate por fornecer os Kits de higiene bucal que foram entregues ao longo da pesquisa.

À Fanconi Anemia Research Fund (FARF) que me concedeu a oportunidade de mergulhar ainda mais no conhecimento da doença, proporcionando viagens de muito aprendizado.

À Universidade da Carolina do Norte UNC, a todos os técnicos e professores que estiveram envolvidos no processamento e análise das amostras. Em especial à professora Flávia Teles pela oportunidade de fazer parte de um trabalho sério e inovador. Aprendi muito sobre a microbiota da boca, mas reconheço que ainda há muito para ser explorado.

À professora Geisla que chegou de maneira simples, sempre disposta em contribuir. Foram várias conversas via Skype, depois a vinda para Curitiba para me ensinar na coleta de dados. E sorte a minha, tive o prazer de tê-la como professora, me ajudando de perto nessa reta final. Foram muitos os seus ensinamentos.

E por fim, ao meu orientador e amigo professor Cassius Carvalho Torres-Pereira, você acreditou e confiou que eu podia dar um pouco mais de mim. Desde o primeiro período da graduação eu almejava ser orientada por você, pois enxergava em você a profissional que gostaria de ser no futuro. Hoje sou grata por estes 5 anos de orientação que tiveram início no PET. Admiro o respeito que você tem pelos pacientes, a maneira como ensina seus alunos, a sua capacidade de pensar além do convencional e por buscar sempre mais para nossa universidade.

Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A anemia de Fanconi (AF) é uma síndrome genética rara caracterizada por instabilidade cromossômica e dificuldade de reparo do DNA. Pacientes com AF desenvolvem o carcinoma de células escamosas (CCE) na boca mais cedo e com maior frequência que a população em geral, especialmente após o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH). Embora tenha aumentado a evidência de um papel etiológico da microbiota local e o processo de carcinogênese; não existem informações sobre a microbiota bucal de pacientes com AF. O objetivo desse estudo foi explorar a microbiota salivar de 61 pacientes com AF e comparar os resultados com a condição de saúde bucal e fatores de riscos associados ao desenvolvimento do CCE. Depois de responder a um questionário e ser submetido a um exame clínico intrabucal, todos os pacientes passaram por um etapa de coleta de saliva e as amostras foram analisadas utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA (Região Hipervariável :V3-V4 Miseq, Illumina). O perfil microbiano associado aos parâmetros clínicos e dados retirados de prontuário médico foram analisados utilizando modelos lineares. A mediana de idade da amostra estudada foi de 22 anos e a maioria deles haviam sido submetidos ao TCTH (n=53). Os filos bacterianos mais abundantes foram *Firmicutes* (média da abundância relativa \pm desvio padrão(DP)) (42,1% \pm 10,1%) e *Bacteroidetes* (25,4% \pm 11,4%). O histórico de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) bucal (n=27) estava associada com maiores proporções de *Firmicutes* (43,8% x 38,5%, $p = 0,05$) quando comparados com os que não apresentaram DECH. Altos níveis de sangramento gengival foram associados com os gêneros *Prevotella* (22,25% x 20%), *Streptococcus* (19,83% x 17,61%), *Porphyromonas* (3,63% x 1,42%, $p = 0,03$), *Treponema* (1,02% x 0,28%, $p = 0,009$), *Parvimonas* (0,28% x 0,07%, $p = 0,02$) e *Dialister* (0,27% x 0,10%, $p = 0,04$). Por fim, pacientes transplantados à mais de 11 anos mostraram níveis mais elevados de *Streptococcus* (18,4%), *Haemophilus* (12,7%) e *Neisseria* (6,8%). Em conclusão, pacientes com AF que apresentavam piores condições de higiene bucal abrigavam maiores proporções de gêneros de bactérias compatíveis com doença periodontal. Foram observadas diferenças microbianas específicas, na presença de longo tempo de transplante, histórico de GVHD e mucosite, bem como, na presença de lesões com potencial de malignidade.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi. Câncer bucal. Microbiota. Saliva. Bactéria. Sequenciamento de Nucleotídeos de Alto Rendimento.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease characterized by chromosomal instability and impaired DNA damage repair. FA patients develop oral squamous cell carcinoma (OSCC) earlier and more frequently than the general population, especially after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Although evidence of an etiological role of the local microbiome and carcinogenesis has grown, no information exists regarding the oral microbiome of FA patients. The aim of this study was to explore the salivary microbiome of 61 FA patients regarding their oral health status and OSCC risk factors. After answering a questionnaire and receiving oral clinical examination, saliva samples were collected and analyzed using 16rRNA sequencing (V3-V4 hypervariable region, MiSeq, Illumina). The microbial profiles associated with medical and clinical parameters were analyzed using general linear models. Patients were young (mean age = 22 yrs old) and most of them had received HSCT (n=53). The most abundant phyla were *Firmicutes* (mean relative abundance \pm SD) (42.1% \pm 10.1%) and *Bacteroidetes* (25.4% \pm 11.4%). A history of graft-versus-host disease (GVHD) (n=27) was associated with higher proportions of *Firmicutes* (43.8% x 38.5%, p=0.05). High levels of gingival bleeding were associated with the genera *Prevotella* (22.25% x 20%), *Streptococcus* (19.83% x 17.61%), *Porphyromonas* (3.63% x 1.42%, p=0.03), *Treponema* (1.02% x 0.28%, p=0.009), *Parvimonas* (0.28% x 0.07%, p=0.02) and *Dialister* (0.27% x 0.10%, p=0.04). Finally, participants transplanted longer than 11 years showed highest levels of *Streptococcus* (18.4%), *Haemophilus* (12.7%) and *Neisseria* (6.8%). In conclusion, FA patients with poor oral hygiene harbored higher proportions of genera of bacteria compatible with gingival disease. Specific microbial differences were observed in the presence of a history of long time since HSCT, history of oral GVHD and mucositis as well when potential malignant oral lesion was present.

Keywords: Fanconi anemia. Oral cancer. Microbiome. Saliva. Bacteria. Massively-Parallel Sequencing.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	PRINCIPAIS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA DE FANCONI E SUA FREQUÊNCIA.....	23
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	PORCENTAGEM DE SONDAS DE DNA BACTERIANO DE DIFERENTES SÍTIOS DA BOCA.....	31
FIGURA 2	DIVISÃO DAS BACTÉRIAS EM COMPLEXOS MICROBIANOS.....	32
FIGURA 3	PRINCIPAIS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS PRESENTES NO SULCO GENGIVAL.....	33
FIGURA 4	DIFERENÇAS NA COMPOSIÇÃO DO BIOFILME SUBGENGIVAL EM PACIENTES SAUDÁVEIS X PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL	34
FIGURA 5	DIFERENÇAS NAS CONTAGENS MÉDIAS DE BACTÉRIAS SUPRA E SUBGENGIVAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM DOENÇA PERIODONTAL	35
FIGURA 6	REPRESENTAÇÃO DO GENE 16S rRNA BACTERIANO.....	38
FIGURA 7	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA DE SANGER....	39
FIGURA 8	ESQUEMA REPRESENTANDO AS ETAPAS DE SEQUENCIAMENTO ILLUMINA.....	41
FIGURA 9	CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE INTERESSE	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DOS PARTICIPANTES (n=61)	48
TABELA 2	ESTADO DE SAÚDE BUCAL DOS PARTICIPANTES	49
TABELA 3	DESCRIÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA O CCE EM PACIENTES COM AF	51

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	PERFIL MICROBIANO DA POPULAÇÃO EM NÍVEL DE FILO	52
GRÁFICO 2	PERFIL MICROBIANO EM NÍVEL DE GÊNERO.....	53
GRÁFICO 3	PERFIL MICROBIANO X AUTOPERCEPÇÃO DE SAÚDE BUCAL..	54
GRÁFICO 4	PERFIL MICROBIANO X RELATO DE SANGRAMENTO GENGIVAL.....	55
GRÁFICO 5	PERFIL MICROBIANO EM RELAÇÃO AO CPO-D.....	56
GRÁFICO 6	PERFIL MICROBIANO EM RELAÇÃO AO IPV E ISG.....	57
GRÁFICO 7	PERFIL MICROBIANO DE ACORDO COM O GRUPO DE RISCO...	58
GRÁFICO 8	PERFIL MICROBIANO DE PACIENTES COM LPM.....	59
GRÁFICO 9	PERFIL MICROBIANO DE PACIENTES COM HISTÓRICO DE DECH BUCAL	60
GRÁFICO 10	PERFIL MICROBIANO DE ACORDO COM O HISTÓRICO DE MUCOSITE	61
GRÁFICO 11	PERFIL MICROBIANO DE ACORDO COM O TEMPO DE TCTH.....	62
GRÁFICO 12	PERFIL MICROBIANO EM RELAÇÃO AO TEMPO DE TCTH.....	63

LISTA DE SIGLAS

16S rRNA	- Ácido Ribonucleico Ribossomal
AAS	- Anemia Aplásica Severa
AF	- Anemia de Fanconi
BRCA2	- Breast Cancer Suscetibility Gene 2
CCE	- Carcinoma de Células Escamosas
CEP	- Comitê de Ética Em Pesquisa
CPO-D	- Dentes Permanentes Cariados, Perdidos e Obturados
ddNTPS	- Dideoxidonucleotídeos
DEB	- Diepoxibutano
DECH	- Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DP	- Desvio Padrão
FANCA	- Proteína Da Anemia De Fanconi Do Grupo A
FANCB	- Proteína Da Anemia De Fanconi Do Grupo B
FANCC	- Proteína Da Anemia De Fanconi Do Grupo C
FANCD1	- Proteína Da Anemia De Fanconi Do Grupo D1
FDR	- Taxa de Falsas Descobertas
G-CSF	- Fator Estimulador de Granulócitos
HC	- Hospital de Clínicas
HPV	- Papiloma Vírus Humano
IPV	- Índice de Placa Visível
ISG	- Índice de Sangramento Gengival
LMA	- Leucemia Mieloide Aguda
LPM	- Lesão Potencialmente Maligna
MISEQ	- Sequenciador Illumina
MMC	- Mitomicina C
NGS	- Sequenciamento de Nova Geração
Otus	- Unidades Operacionais Taxonômicas
p	- Significância Estatística
pb	- Pares de Bases
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
QIIME	- Quantitative Insights Into Microbial Ecology
SMD	- Síndrome Mielodisplásica
SPSS	- <i>Statistical Package For The Social Sciences</i>
TALE	- Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	- Transplante de Células tronco Hematopoéticas
TE	- Solução Tampão
UCLUST	- Método de Análise das Unidades Operacionais Taxonômicas
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
WHO	- World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	ANEMIA DE FANCONI.....	21
2.2	DIAGNÓSTICO DA ANEMIA DE FANCONI.....	22
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA DE FANCONI.....	23
2.4	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER	24
2.5	ALTERAÇÕES BUCAIS DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI	25
2.6	TRATAMENTO DA ANEMIA DE FANCONI	26
2.7	COMPLICAÇÕES BUCAIS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS.....	27
2.7.1	Doença do enxerto contra o hospedeiro.....	28
2.7.2	Carcinoma de células escamosas na boca	28
2.8	COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL BACTERIANA.....	30
2.8.1	Composição da Microbiota Periodontal	31
2.9	ALTERAÇÕES DE MICROBIOTA E O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOAS BUCAL	35
2.10	MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL	37
2.10.1	Técnicas de sequenciamento genético bacteriano.....	38
2.10.1.1	Sequenciamento Miseq Illumina.....	40
3	METODOLOGIA	42
3.1	APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA.....	42
3.2	DESENHO DO ESTUDO.....	42
3.3	AMOSTRA.....	42
3.3.1	Critérios de Inclusão.....	42
3.3.2	Critérios de Exclusão.....	43
3.4	COLETA DOS DADOS.....	43
3.5	COLETA DE SALIVA E ANÁLISE	43
3.6	EXAME INTRABUCAL	44
3.7	ANÁLISE LABORATORIAL SALIVAR.....	45
3.7.1	Extração do DNA e preparo das amostras para sequenciamento do gene 16S rRNA	45
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4	RESULTADOS.....	47

4.1	CARACTERÍSTICAS SÓCIODEMOGRÁFICAS E COMPORTAMENTAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	47
4.2	PARÂMETROS DE SAÚDE BUCAL	48
4.3	FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO CCE BUCAL EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI	49
4.4	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E PERFIL MICROBIOLÓGICO	50
4.5	PERFIL MICROBIANO ASSOCIADO AOS PARÂMETROS CLÍNICOS DE SAÚDE BUCAL	54
4.6	PERFIL MICROBIANO ASSOCIADO AOS FATORES DE RISCO PARA O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA ANEMIA DE FANCONI	57
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MAIORES DE 18 ANOS DE IDADE.....	80
	APÊNDICE 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PAIS.....	83
	APÊNDICE 3- TERMO DE ASSENTIMENTO PARA ADOLESCENTES MAIORES DE 12 ANOS DE IDADE.....	86
	APÊNDICE 4- QUESTIONÁRIO.....	89
	APÊNDICE 5- FICHA CLÍNICA.....	91
	ANEXO 1- TERMOS DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA BRASILEIRO.....	93
	ANEXO 2- TERMOS DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA INTERNACIONAL.....	98
	ANEXO 3- PANFLETO DE HIGIENE BUCAL.....	99
	ANEXO 4- PANFLETO AUTOEXAME BUCAL.....	100

1 INTRODUÇÃO

A anemia de Fanconi (AF) é uma síndrome genética rara caracterizada por instabilidade cromossômica e dificuldade de reparo do DNA. (KEE; D'ANDREA, 2012). Indivíduos com essa doença podem apresentar falência medular progressiva e um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias malignas. O carcinoma de células escamosas (CCE) da região de cabeça e pescoço é o mais comum entre eles. (ALTER, 2005). Estima-se que esses pacientes tenham um risco de até 700 vezes quando comparados com a população em geral, mesmo na ausência de fatores de risco tradicionalmente conhecidos tais como o tabaco e o álcool. (ROMICK-ROSENDALE et al., 2013; ALTER, 2014). O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) é o único tratamento com chances de cura das alterações hematológicas, no entanto ele aumenta o risco de desenvolvimento de tumores sólidos em até 4 vezes, principalmente em pacientes com histórico de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). (ALTER, 2005).

As causas para a alta incidência do CCE bucal em pacientes com AF ainda não está elucidada. Alguns autores sugerem que a presença do papiloma vírus humano (HPV) pode ser um contribuinte importante para o aparecimento de câncer nessa população. (KUTLER et al., 2003; ARAUJO et al., 2011; PARK et al., 2013). No entanto esses resultados divergem de outros estudos que não encontraram a presença de HPV nos casos de tumores de cabeça e pescoço de indivíduos com AF. (LOWY, 2003; ZEEBURG et al., 2004, 2008). Por outro lado, alguns autores têm demonstrado evidências de uma possível associação entre as bactérias e o desenvolvimento do câncer. Níveis elevados de bactérias tais como *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, *Chlamydia trachomatis* e *Fusobacterium nucleatum* têm sido associados ao desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico, carcinoma de cólon, câncer de colo uterino e carcinoma colorretal respectivamente. (ELLMERICH et al., 2000; WALLIN et al., 2002; CORREA; HOUGHTON, 2007; MIMA et al., 2015). Embora essa associação nem sempre implique em causalidade, vários mecanismos têm sido propostos. As modificações genéticas diretas ao DNA (BEBEK et al., 2012) tais como inflamação e síntese de metabólitos com potencial carcinogênico são as principais descrições encontradas na literatura. (SCHWABE; JOBIN, 2013). Quando a microbiota salivar de pacientes com câncer bucal foi comparada com a de

pacientes sem a doença, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas. Esses resultados sugerem que a microbiota salivar pode contribuir com o diagnóstico de câncer bucal. (MAGER et al., 2005). A boca pode abrigar cerca de 700 espécies bacterianas, das quais, estima-se que aproximadamente 35% ainda não foram cultivadas em laboratório. (DEWHIRST et al., 2010). Estudos têm apontado que o sequenciamento genético do gene 16S rRNA tem contribuído para o melhor entendimento da microbiota bucal tanto em casos de saúde como na presença de doença. (PUSHALKAR. et al., 2012; SCHMIDT et al., 2014).

Para pacientes com AF, são poucos os estudos descritos na literatura que avaliaram a microbiota bucal. (YALMAN et al., 2001; LYKO et al., 2013). Essa informação é de extrema relevância visto o alto risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas em especial na mucosa bucal. É necessário conhecer o padrão de “normalidade” microbiológica desses indivíduos e depois determinar mecanismos que podem estar presentes na transição de saúde para doença, visto o acúmulo de evidências de um possível papel dos microrganismos no processo de transformação malignas. Além disso, o desenvolvimento de neoplasias sólidas, especialmente o CCE bucal, tem sido a principal causa de mortalidade nessa população. (KHAN; ROSENBERG; ALTER, 2015; BONFIM et al., 2016). Frente a isso, o objetivo deste estudo foi explorar o perfil microbiano salivar de pacientes com AF, compará-lo com a sua condição de saúde bucal e com algumas variáveis de risco para o desenvolvimento de câncer bucal nessa população.

1.1 OBJETIVO GERAL

Explorar o perfil microbiano salivar de indivíduos com AF e correlacionar ao seu estado de saúde bucal analisando variáveis de risco já conhecidas para o desenvolvimento de câncer nessa população.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANEMIA DE FANCONI

A AF é uma doença genética rara de caráter predominantemente autossômico recessivo. Sendo que, cerca de 2% dos casos estão relacionados a alterações em genes ligados ao cromossomo X. (MEETEI et al., 2004; ALTER; KUPFER, 2013). Em 1927, o pesquisador e médico Guido Fanconi descreveu pela primeira vez três casos de irmãos com malformações congênitas e com anemia progressiva. Anos mais tarde a doença foi descrita como uma anemia do tipo constitucional na qual os pacientes apresentavam instabilidade cromossômica, falência medular e predisposição ao desenvolvimento de neoplasias malignas. (FANCONI, 1967). O risco para o desenvolvimento de malignidades foi estimado ser 50 vezes superior quando comparado com a população em geral. Isoladamente, o risco para o desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA) é de 700 vezes e tumores sólidos em até 40 vezes. (ALTER, 2014).

A AF já foi descrita em todas as etnias, não apresenta predileção por sexo e a sua incidência é de aproximadamente 1/200.000-400.000 nascidos vivos. Estima-se que em algumas populações esse número poderia ser ainda maior (DONG et al., 2015) e que a cada 300 pessoas, uma seria portadora de algum tipo de gene causador da doença. Nos Estados Unidos a heterozigose foi descrita em 1:181 pessoas e em Israel 1:70. (D'ANDREA, 2003; ROSENBERG et al., 2011). Não existem relatos sobre a incidência da AF na população brasileira.

A expectativa de vida para indivíduos com AF tem sido estimada em aproximadamente 33 anos. (ALTER et al., 2010). No entanto, com os avanços no tratamento e com o TCTH, esta média tem aumentado. (BONFIM et al., 2016).

Em nível molecular, a AF apresenta grande diversidade genética. O primeiro gene descoberto foi o FANCC em 1992 e, até o momento, já foram descritos 19 genes relacionados à condição. (DONG et al., 2015). Essa variabilidade genética é considerada responsável pelas diferentes manifestações clínicas que a doença pode apresentar. Em sua maioria os genes são autossômicos recessivos com exceção do gene FANCB encontrado no cromossomo X. Em relação à prevalência, o gene FANCA e FANCC aparecem em 85% dos casos. (MEETEI et al., 2004; ALTER, 2014; DONG et al., 2015). O gene FANCD1(BRCA2) vem sendo intensamente

estudado em relação ao câncer já que 97% dos pacientes com esse gene desenvolvem algum tipo de malignidade ainda na primeira infância. Além disso, ele pode estar associado aos casos de câncer de mama, ovário e carcinoma hepatocelular. (ALTER, 2014; FERROUDJ et al., 2016). Em geral, os genes são responsáveis pela sinalização e reparo celular e, por estarem alterados em pacientes com AF, resultam em dificuldade de reparo do DNA, o que caracteriza o seu risco aumentado para o desenvolvimento de malignidades. (DONG et al., 2015). Na população brasileira o gene FANCA foi encontrado em 30% dos pacientes avaliados (n=80). (MAGDALENA et al., 2005).

2.2 DIAGNÓSTICO DA ANEMIA DE FANCONI

O diagnóstico da AF é realizado por meio das manifestações clínicas e testes laboratoriais que avaliam as quebras cromossômicas no DNA. O principal teste é realizado por meio da coleta de sangue periférico; no qual se avalia a sensibilidade das células quando expostas a agentes clastogênicos tais como o Diepoxibutano (DEB) e a Mitomicina C (MMC). O teste mostra a quantidade de quebras cromossômicas e danos ao DNA na amostra de sangue coletada. Em células normais acontecem um pequeno número de quebras cromossômicas e o DNA consegue se reparar quando estes agentes são adicionados. Em células oriundas de indivíduos com AF essas quebras devem ser superiores a 0,74 para indicar positividade para a doença. Este teste é altamente sensível e é considerado o padrão ouro para diagnóstico. (AUERBACH, 2009, 2015). Para indivíduos que apresentam sensibilidade e resistência aos agentes clastogênicos; como nos casos de mosaïcismo a porcentagem de aberrações cromossômicas é mais importante, (CASTELLA et al., 2011; KEE; D'ANDREA, 2012) e a realização de um teste complementar utilizando um tecido alternativo como, por exemplo, os fibroblastos da pele se faz necessário para confirmar o diagnóstico. (SOULIER et al., 2015).

Em seguida é indicada uma análise de mutações para identificar qual o gene envolvido na doença e qual mutação ele apresenta. Esse teste é o único capaz de confirmar o diagnóstico. (FANCONI ANEMIA RESEARCH FUND (FARF), 2014, p. 33).

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA DE FANCONI

Os indivíduos com AF podem apresentar manifestações subclínicas, discretas ou deformidades esqueléticas severas. Além disso, a maioria deles (>90%) desenvolvem citopenias sintomáticas que podem evoluir para LMA. (AUERBACH, 2009; NEVELING et al., 2009). O quadro 1 descreve as principais manifestações clínicas da doença e sua frequência.

QUADRO 1 PRINCIPAIS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA DE FANCONI E SUA FREQUÊNCIA

	Características	Frequência	Autor
Pele	Manchas café com leite ou Hiperpigmentação	55-60%	(KERVILER et al., 2000; ILURDOZ et al., 2003)
Crescimento	Baixa estatura	> 60%	(ROSE et al. 2012)
	Anormalidades endócrinas	80%	(GIRI et al., 2007; AUERBACH, 2009; ROSE et al., 2012)
Malformações esqueléticas	Hipoplasia ou ausência do rádio	7%	(KERVILER et al., 2000; ALTER; ROSENBERG, 2013)
	Polegar supranumerário ou ausência	35%	(KERVILER et al., 2000; ALTER; ROSENBERG, 2013)
	Alterações faciais	25%	(DOKAL, 2000; AVILA et al., 2014)
Alterações Gonodais	Homens (hipogonadismo)	40-64%	(GIRI et al., 2007; ROSE et al., 2012)
	Mulheres (Falha prematura dos ovários)	40-77%	(GIRI et al., 2007; ROSE et al., 2012)
Outras Alterações	Oculares	23%	(ALTER, 2003)
	Rins e Sistema urinário	20-21%	(ILURDOZ et al., 2003; SHIMAMURA, 2006; ALTER et al., 2010)
	Otológicos (perda da audição)	11-a 50%	(SANTOS et al., 2002; VALE et al., 2008)
	Gastrointestinal (alterações estruturais)	7%	(ALTER, 2003)
	Cardíacos	6%	(ILURDOZ et al., 2003; SHIMAMURA, 2006; ALTER; ROSENBERG, 2013)
Sem alterações		25%	(ALTER, 2003)

FONTE: O Autor (2016).

2.4 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER

As alterações hematológicas podem ser variáveis e aparecer em qualquer idade. No entanto, 75% dos pacientes apresentam aplasias de moderada à grave ainda na primeira década de vida, com uma mediana de 7,6 anos de idade, sendo esta uma das principais causas de óbitos nesse período. (KUTLER et al., 2003; ROSENBERG et al., 2003; AUERBACH, 2009). Essas alterações podem evoluir desde uma citopenia assintomática para anemia aplásica severa (AAS), síndrome mielodisplásica (SMD) ou LMA. (ALTER, 2014).

O risco para o desenvolvimento da SMD é de 40% aos 50 anos de idade e para a LMA é de 15% a 20% aos 40 anos. Além disso, os pacientes com AF apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores sólidos (76% aos 45 anos). (ALTER, 2014).

Os tumores sólidos mais frequentes são aqueles que envolvem a região de cabeça e pescoço, seguido de fígado, cérebro e vulva. (ALTER, 2014). Sabe-se que o risco de câncer é maior nos indivíduos mais velhos, transplantados com doador não aparentado, com histórico de DECH e que fizeram uso de terapia imunossupressora. (ROSENBERG et al., 2005). Alguns autores estimaram o risco para o desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço em 500-700 vezes superior quando comparados com a população em geral (KUTLER et al., 2003; ROSENBERG et al., 2003; ALTER, 2014). Esse risco pode aumentar com o transplante em até 4,4 vezes, e naqueles pacientes com histórico de DECH pode chegar até 33 vezes. Alguns autores afirmam que indivíduos que apresentaram DECH podem não sobreviver até 6 anos de pós TCTH sem o desenvolvimento de algum tipo de câncer. (TISCHKOWITZ; HODGSON, 2003; ROSENBERG, 2005, 2008). Em aproximadamente 14% dos pacientes adultos, o câncer pode ser a 1ª manifestação da doença. (KUTLER et al., 2003). O tempo médio em que esses tumores ocorrem é de 7 a 10 anos após o TCTH, mas já foram encontrados casos descritos na literatura com 1 ano de pós transplante. (MILLEN et al., 1997; KUTLER et al., 2003; ROSENBERG, 2005; BONFIM et al., 2016).

2.5 ALTERAÇÕES BUCAIS DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI

A literatura é conflitante quanto à prevalência e características das condições dentárias de indivíduos com AF. Alguns estudos apontam que estes indivíduos apresentam alterações dentárias, ósseas e em mucosas. As principais são a microdontia, as agenesias dentárias, os dentes supranumerários, as alterações de forma e posição, o taurodontismo, as raízes afiladas e dilaceradas e os defeitos de esmalte. (ARAUJO et al., 2007; TEKCICEK et al., 2007). O atraso no desenvolvimento dentário foi sugerido por um único estudo que comparou a diferença entre a idade cronológica e a idade dentária em 30 pacientes com AF. (KOUBIK et al., 2006). No entanto, não se sabe se essas alterações estão correlacionadas com o fenótipo da doença. A cárie, gengivite e a periodontite crônica são as doenças bucais mais frequentes em pacientes com AF. Todos os estudos apontaram uma higiene bucal deficiente e um índice elevado de doença periodontal nessa população. (AÇIKGÖZ et al., 2005; ARAUJO et al., 2007; TEKCICEK et al., 2007; LYKO et al., 2016). Araújo et al. (2007) avaliaram 33 pacientes e verificaram que 50% deles apresentavam sangramento gengival e que o mesmo não estava associado à plaquetopenia. Já Lyko et al. (2016) compararam a saúde bucal de 35 pacientes com AF a um grupo controle e concluíram que apesar dos pacientes apresentarem um alto índice de doenças periodontais os mesmos não eram diferentes dos resultados encontrados na população não afetada. Em relação a carie dental a prevalência foi estimada em 35% e não apresentou diferença entre pacientes transplantados e não transplantados. (YALMAN et al., 2001; AÇIKGÖZ et al., 2005; TEKCICEK et al., 2007; LYKO et al., 2013).

Alguns autores relataram variações quanto ao tamanho do crânio e alterações faciais importantes em pacientes com AF. Um estudo avaliou o perfil facial de 50 indivíduos e comparou com os padrões de normalidade. Os autores concluíram que pacientes com AF apresentam medidas ósseas menores, mandíbula com menor comprimento do corpo e ramo, menor base do crânio e um padrão dolicofacial com crescimento vertical. (GIAMPIETRO et al., 1997; KERVILER et al., 2000; AVILA et al., 2014).

Quanto às alterações de mucosa da boca; um estudo com 138 pacientes com AF não transplantados mostrou maior frequência de lesões de origem traumática (hiperceratoses friccionais), leucoplasias, lesões associadas à medicação

(hiperplasias gengivais) ou associadas às condições de neutropenia (úlcera neutropênica, hematomas e petéquias). A prevalência de leucoplasias foi de 12% neste grupo de não transplantados o que chama a atenção para a possibilidade desta lesão caracterizar um fenótipo da própria síndrome. (CAVALCANTI et al., 2015a 2015b).

2.6 TRATAMENTO DA ANEMIA DE FANCONI

O tratamento da AF se dá de acordo com as suas manifestações clínicas e é uma decisão conjunta da equipe médica multiprofissional com o paciente e seus familiares. (FARF, 2014, p. 52). Atualmente os tratamentos para a falência medular são: Uso de andrógenos, fatores de crescimento sintéticos e o TCTH.

Os andrógenos sintéticos (Oximetolona) são utilizados no tratamento da AF desde 1961. Seus benefícios estão mais relacionados ao aumento de células vermelhas e plaquetas. (DIAMOND; SHAHIDI, 1967; ALTER et al., 2010). Mais da metade dos pacientes respondem bem ao tratamento. Porém, cerca de 10 a 20% se tornam refratários, necessitando do TCTH. (TISCHKOWITZ; DOKAL, 2004; TANIGUCHI; D'ANDREA, 2006). Os efeitos colaterais são bem conhecidos e compreendem masculinização, acne, fechamento precoce das cartilagens provocando baixa estatura, adenomas hepáticos e um risco aumentado para o desenvolvimento do adenocarcinoma hepático. (TISCHKOWITZ; DOKAL, 2004; VELAZQUEZ; ALTER, 2004). A Oxandrolona e o Danazol vêm sendo empregados como substitutos por apresentarem efeitos colaterais mais brandos. Os estudos tem demonstrado que os mesmos apresentam uma boa eficácia. (SCHECKENBACH et al., 2012; ROSE et al., 2014).

Tratamentos alternativos vêm sendo propostos, como é o caso da terapia gênica que consiste na reedição *in vitro* de um gene da doença alterado e na posterior infusão desse gene saudável no paciente. (FARF, 2014, p. 260). Os resultados experimentais são promissores. (MACMILLAN et al., 2011; TOLAR et al., 2012; MÜLLER et al., 2012; MOLINA-ESTEVEZ et al., 2015). No entanto, o TCTH alogênico é o único tratamento com chance de cura das complicações hematológicas e recuperação da hematopoese celular. O procedimento consiste na infusão de células progenitoras da medula óssea, sangue periférico ou cordão

umbilical de um doador compatível para outro receptor. (MACMILLAN et al., 2011; WINGARD et al., 2011). Antes que o paciente receba a infusão das células é necessário que ele passe por um regime de condicionamento com agentes citotóxicos e imunossupressores que tem por objetivo erradicar as células do receptor para que possa ocorrer a pega das células do doador e prevenir a DECH. (WINGARD et al., 2011). Pacientes com AF são sensíveis a radio e quimioterapia e os medicamentos utilizados para o condicionamento são altamente tóxicos. Alterações nos protocolos convencionais de condicionamento foram necessárias para garantir uma menor toxicidade ao paciente. Com o ajuste da dose houve um aumento na sobrevida de 89% para pacientes submetidos ao TCTH abaixo de 10 anos. (MEDEIROS et al., 1999; BONFIM et al., 2007; GLUCKMAN; WAGNER, 2008; PASQUINI et al., 2008). Apesar do transplante alogênico com doadores não aparentados ter evoluído ao longo dos anos, o melhor prognóstico é para aqueles pacientes mais jovens, que receberam poucas transfusões ou nenhuma, que possuem doadores irmãos compatíveis e ou aqueles em fase precoce da doença ou em fase de aplasia. (MACMILLAN et al., 2011; WINGARD et al., 2011).

2.7 COMPLICAÇÕES BUCAIS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS

Apesar de o TCTH ser o único tratamento com chances de cura das manifestações hematológicas; ele pode trazer consigo algumas complicações e comorbidades para o paciente no curto, médio e longo prazo. A toxicidade gastrointestinal é importante e a boca é acometida em quase 80% dos casos, sendo a mucosite a mais frequente. Nos pacientes com AF, a mucosite geralmente ocorre entre os dias +6 ao +12 e tende-se a resolver por volta do dia +16. (EPSTEIN et al., 2009; TORRES-PEREIRA, 2002). No estudo realizado por Torres-Pereira (2002), 97% (n=34) dos pacientes com AF sobreviventes até o dia +100, apresentaram mucosite grau III e IV e a gravidade estava positivamente associada à dose ou ao quimioterápico utilizado no condicionamento. Quando comparados com pacientes com AAS, indivíduos com AF apresentaram médias mais elevadas de mucosite bucal utilizando o mesmo protocolo de condicionamento. Apesar da alta prevalência de mucosite, a complicação de maior preocupação pós TCTH é a DECH. Ela é a

principal causa de mortalidade nos dois primeiros anos de transplante. (SOCIÉ et al., 1998; KUTEN-SHORRER et al., 2014; BONFIM et al., 2016).

2.7.1 Doença do enxerto contra o hospedeiro

A DECH é considerada uma síndrome clínico patológica, em que as células T do doador presentes no enxerto reconhecem antígenos do tecido do paciente como estranhos e induzem resposta imune, causando dano tecidual. (PAVLETIC et al., 2006). Ela pode ser classificada como DECH aguda ou crônica dependendo do período em que ocorre e também de quais manifestações clínicas o paciente apresenta. (DEEG et al., 1996; MAYS et al., 2013). A DECH aguda tende a se manifestar logo após o transplante, normalmente atinge órgãos como pele, fígado e trato gastrointestinal. Na boca cerca de 35% a 60% dos pacientes apresentam úlceras dolorosas, eritema e atrofia da mucosa. A DECH crônica por sua vez, atinge cerca de 50% dos pacientes e se manifesta em diversos graus. A boca é o segundo sítio mais acometido, muitas vezes sinalizando a presença da doença em outros órgãos. (WOO et al., 1997; KUTEN-SHORRER et al., 2014). Um estudo que avaliou 96 pacientes com AF encontrou uma prevalência de 42% de DECH bucal, sendo a placa branca a mais frequente e a mucosa jugal e palato os sítios de maior acometimento. (CAVALCANTI et al., 2015a). Em geral a grande preocupação da equipe multidisciplinar é que pacientes com histórico de DECH bucal apresentam um risco aumentando para o desenvolvimento do CCE da boca quando comparados aos pacientes que não manifestaram a doença. (CURTIS et al., 2005).

2.7.2 Carcinoma de células escamosas na boca

O CCE da boca representa 2/3 de todos os casos de malignidades que acometem a região de cabeça e pescoço de pacientes com AF. (VELLEUER; DIETRICH, 2014). Sua ocorrência não tem predileção por sexo, sendo a faixa etária de maior acometimento, adultos jovens de 20 a 40 anos. (KUTLER et al., 2003, FARF, 2014, p.272). O caso mais novo referido na literatura foi na língua de um menino de 10 anos de idade. (MASSEROT et al., 2016). Em pacientes transplantados, o câncer acontece mais cedo e com uma mediana de 10 anos de

TCTH. (ROSENBERG et al., 2005). Cerca de 60% dos pacientes desenvolvem um segundo tumor primário, que normalmente acomete o trato geniturinário. (FARF, 2014, p.273). Clinicamente e histologicamente a manifestação do CCE na AF é similar ao observado na população em geral e quanto à localização, o bordo lingual é o sítio de maior acometimento, seguido de gengiva, mucosa jugal e região do trigono retromolar. (KUTLER et al., 2003; MASSEROT et al., 2008; ZEEBURG et al., 2008; BIRKELAND et al., 2011; KUTLER et al., 2015; BONFIM et al., 2016). Dois estudos recentes descreveram 25 casos de câncer restritos a cavidade bucal, sendo que 19 (76%) eram localizados na língua e destes, treze indivíduos haviam sido submetidos ao TCTH com uma média de 8 anos. (KUTLER et al., 2015; BONFIM et al., 2016).

Pacientes com AF apresentam sensibilidade a radio e quimioterapia, sendo a cirurgia o tratamento de eleição. Em sua maioria os casos são diagnosticados tardiamente, dificultando o tratamento. (GLUCKMAN, 1990). Em casos de estágio mais avançado em que não é possível realizar a cirurgia, a radioterapia se faz necessária. Não existe um protocolo definido na literatura para realização da quimioterapia. (SCHECKENBACH et al., 2012; WONG et al., 2013). A decisão deve ser individualizada respeitando as características clínicas do paciente. As chances de cura devem ser ponderadas com o prognóstico e futuras complicações. (BIRKELAND et al., 2011). Um paciente faleceu 14 dias após o final do tratamento com radioterapia e o maior tempo de acompanhamento encontrado foi de 5 anos após irradiação. (BREMER et al., 2003). Em geral, a sobrevida de 2 anos após o tratamento do câncer é menor que 50%. (REUTER et al., 2010). Um consenso de especialistas recomenda que pacientes com AF tenham acompanhamento com um especialista em lesões bucais a cada 6 meses e se o mesmo apresentar lesões potencialmente malignas (LPM) que esse tempo seja reduzido para uma consulta a cada 3 meses. (MAJHAIL et al., 2012). Um estudo realizado com 47 pacientes com AF adultos, comparou o autoexame de boca com o exame profissional. O resultados apontaram uma acurácia de 43% e os autores concluíram que embora a acurácia não fosse suficiente para indicar o autoexame como uma ferramenta de prevenção, o mesmo poderia ser recomendado para essa população visto o risco elevado para o desenvolvimento de neoplasias malignas e a ausência de estratégias eficazes de prevenção. (FURQUIM et al., 2014) .

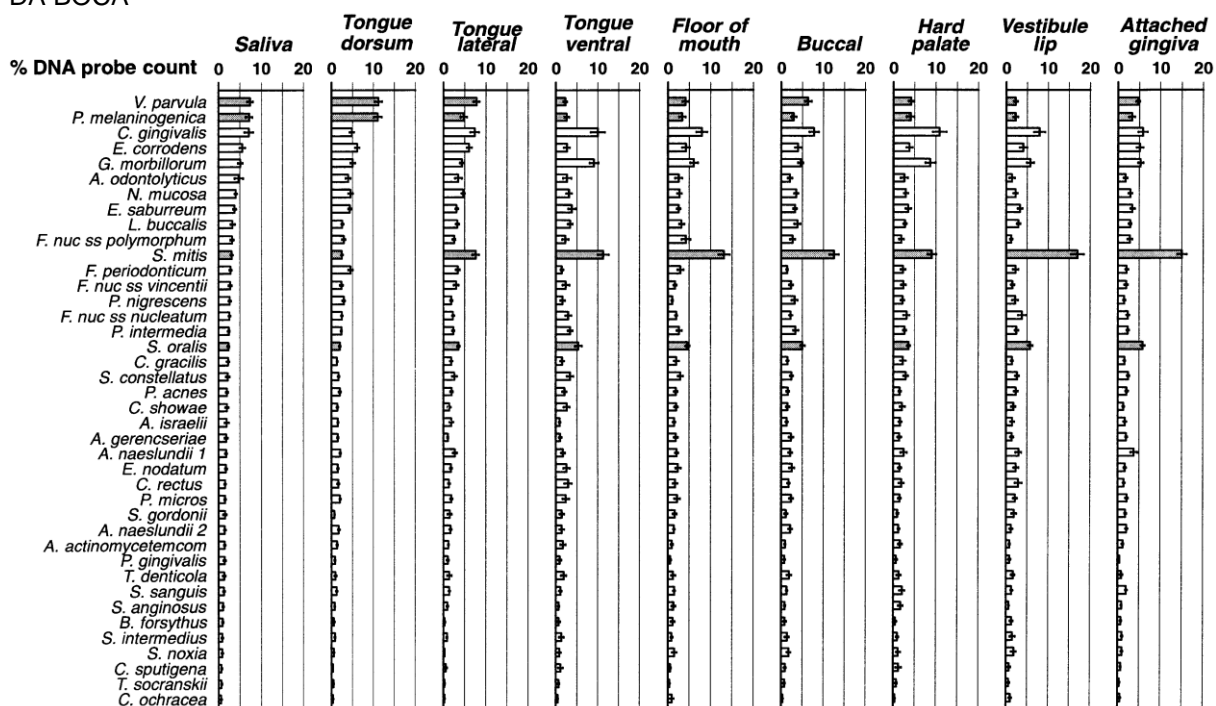
A etiologia do CCE ainda não está bem elucidada nessa população e a maioria dos pacientes não apresentam os fatores de risco tradicionalmente descritos para a população em geral, como o uso do tabaco e álcool. (FARF, 2014, p. 272). Alguns autores sugerem que o estresse oxidativo e a presença de microrganismos tais como o HPV possam ser os responsáveis para o desenvolvimento do CCE na boca. (REUTER et al., 2010; ARAUJO et al., 2011; WINER et al., 2014; SAUTER et al., 2015). Alguns autores encontraram maior prevalência de HPV bucal em pacientes com AF quando comparados com o grupo controle. (ARAUJO et al., 2011; WINER et al., 2014; SAUTER et al., 2015). Kutler et al. (2003) encontrou uma prevalência de 84% de HPV positivo na boca. No entanto os resultados sobre a prevalência do HPV e seu envolvimento com o CCE de boca é contraditório. (ZEEBURG et al., 2004, 2008). Um estudo avaliou 67 pacientes com AF e verificou que a prevalência do HPV foi semelhante ao encontrado na população em geral, além disso, não foi encontrado nenhum caso de HPV-16 que normalmente é associado ao câncer na amostra estudada (WINER et al., 2014). Alguns autores sugerem que o HPV está mais associado aos casos da região orofaringe e a sua presença não parece implicar na causa do câncer bucal nessa população. Técnicas mais sensíveis são necessárias para evitar a quantidade de falso negativo e elucidar melhor a relação entre o vírus e o desenvolvimento da doença. (ALTER et al., 2013; MONSJOU et al., 2013).

2.8 COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL BACTERIANA

A boca apresenta uma grande diversidade de microrganismos e estima-se que ela carregue cerca de 700 espécies bacterianas. As bactérias estão organizadas em complexos (comunidades) dos quais compartilham de uma relação de comensalismo e simbiose. A organização desses microrganismos em complexos se dá devido a boca apresentar diversos nichos.(DEWHIRST et al., 2010). As bactérias presentes na superfície dental divergem daquelas encontradas no sulco gengival bem como daquelas presentes na saliva e nos tecidos bucais.(MAGER et al., 2003; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Os 6 filos bacterianos com maior abundância relativa na cavidade bucal são os *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, e *Fusobacteria*. (DEWHIRST et al., 2010). Os gêneros

mais prevalentes são *Actinomyces*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Rothia*, *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Treponema*, e *TM7 genera 1 e5*. (LIU et al., 2012). Em nível de espécies, um estudo avaliou diferentes sítios da boca de 225 pacientes periodontalmente saudáveis. Os resultados referentes as 40 espécies de bactérias mais comuns e a sua distribuição por sítio está demonstrado na FIGURA 1. Os autores concluíram que as bactérias são sítios dependentes e que existem semelhanças na composição da microbiota salivar e língua.

FIGURA 1 PORCENTAGEM DE SONDAS DE DNA BACTERIANO DE DIFERENTES SÍTIOS DA BOCA



DESCRIÇÃO DA FIGURA: Média das contagens de DNA de 11 diferentes sítios da cavidade bucal de 44 indivíduos saudáveis. As barras em negrito representam diferenças de concentrações em diferentes localizações.

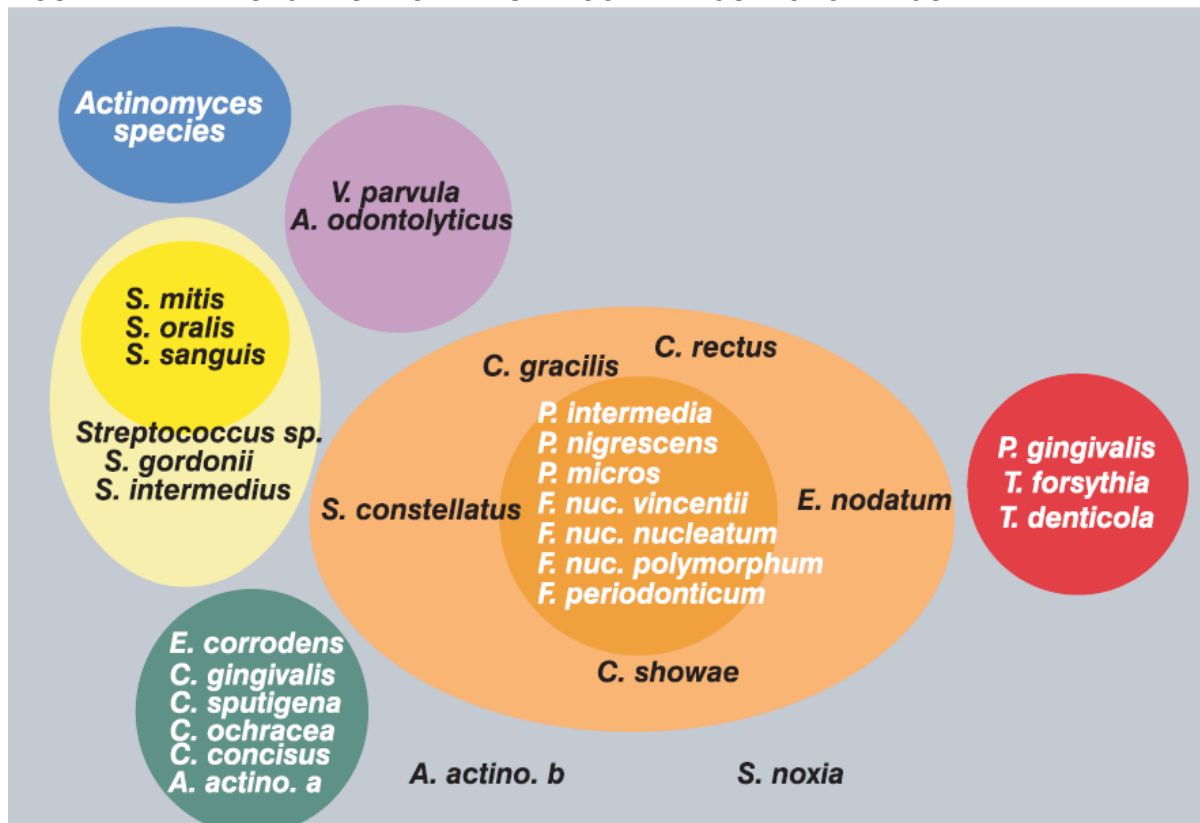
FONTE: MAGER et al. (2003)

2.8.1 Composição da Microbiota Periodontal

A microbiota periodontal necessita de uma descrição isolada por apresentar cerca de 500 espécies de bactérias. (PASTER et al., 2001). Em 1998, um grupo de pesquisadores descreveram quais são essas bactérias e como elas estão organizadas no sulco gengival. (SOCRANSKY et al., 1998). Esses autores classificaram essas bactérias em complexos de acordo com sua organização e

patogenicidade. (FIGURA 2). As principais bactérias encontradas no sulco gengival são descritas na FIGURA 3.

FIGURA 2 DIVISÃO DAS BACTÉRIAS EM COMPLEXOS MICROBIANOS

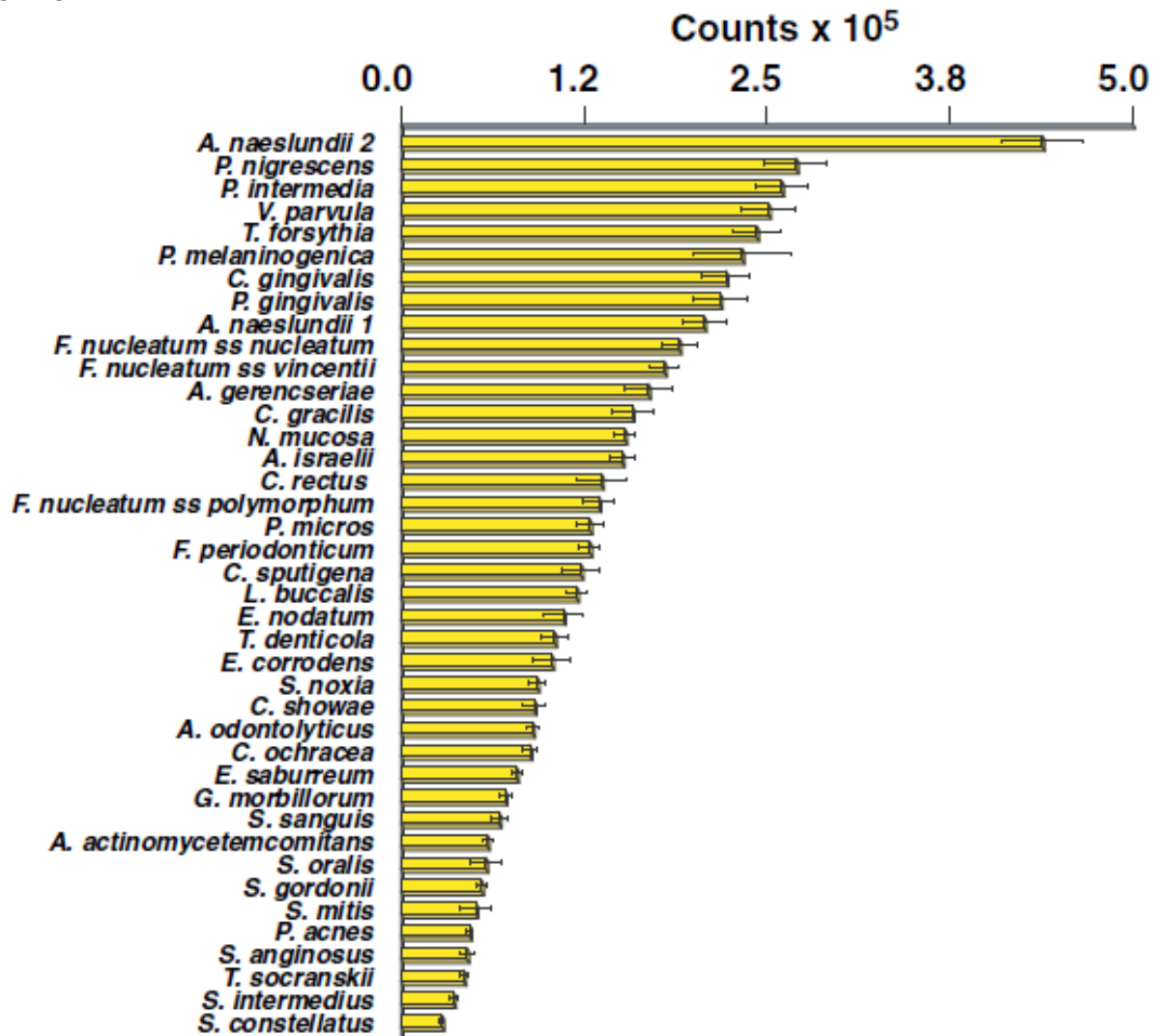


DESCRIÇÃO DA FIGURA: Diagrama representando a relação entre diversas espécies microbianas e entre os diversos complexos. O complexo vermelho indica as bactérias com maior patogenicidade.

FONTE: SOCRANSKY e HAFFAJEE (2005)

Ao comparar a microbiota subgengival de 157 indivíduos periodontalmente saudáveis com 592 portadores de periodontite crônica os autores observaram que a principal diferença está na concentração de microrganismos entre os grupos. Pacientes com periodontite apresentam maior concentração de microrganismos do complexo laranja e vermelho, enquanto pacientes saudáveis apresentam maior abundância de microrganismos do grupo verde (FIGURA 4). As bactérias do complexo laranja e vermelho são as que apresentam maior capacidade de destruição dos tecidos periodontais e estão diretamente ligadas a progressão da doença periodontal. (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005; TELES et al., 2013).

FIGURA 3 PRINCIPAIS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS PRESENTES NO SULCO GENGIVAL

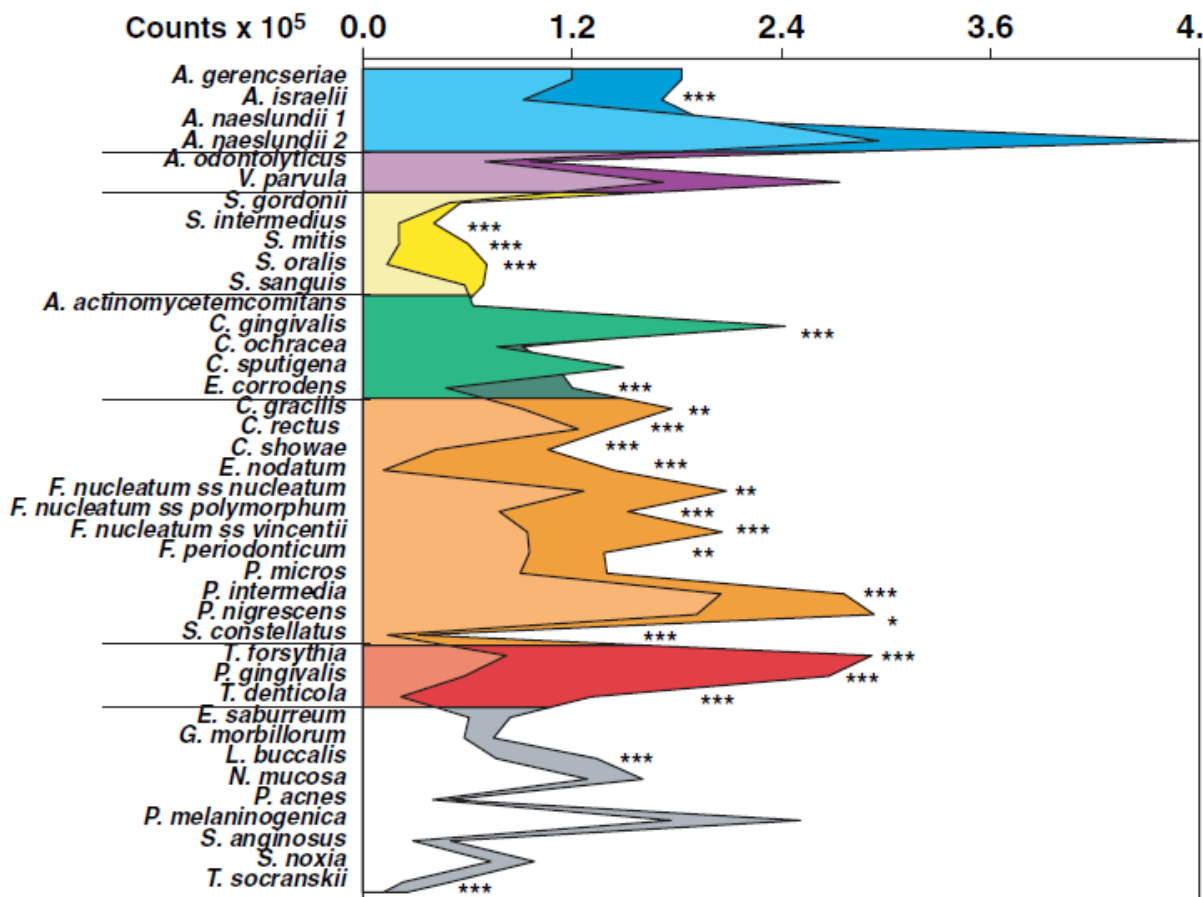


FONTE: SOCRANSKY e HAFFAJEE (2005)

Quando a microbiota subgingival é comparada com a microbiota supragingival é possível observar que a microbiota supragingival apresenta maior concentração de microrganismos e essas diferenças podem ser explicadas pela composição do fluido que compõe cada região, além de apresentar um maior espaço para colonização bacteriana. Em nível de espécie, a principal diferença está na contagem de *Actinomyces* e *Streptococcus Sanguis* que estão aumentados nas amostras supragingivais. E quando ocorre um desequilíbrio bucal ocasionado pela doença periodontal por exemplo é possível observar uma elevação na contagem média de bactérias em indivíduos doentes tanto na região supra e subgingival, principalmente no grupo de bactérias do complexo laranja e vermelho. Essa diferença se dá principalmente por apresentar um maior espaço disponível para a

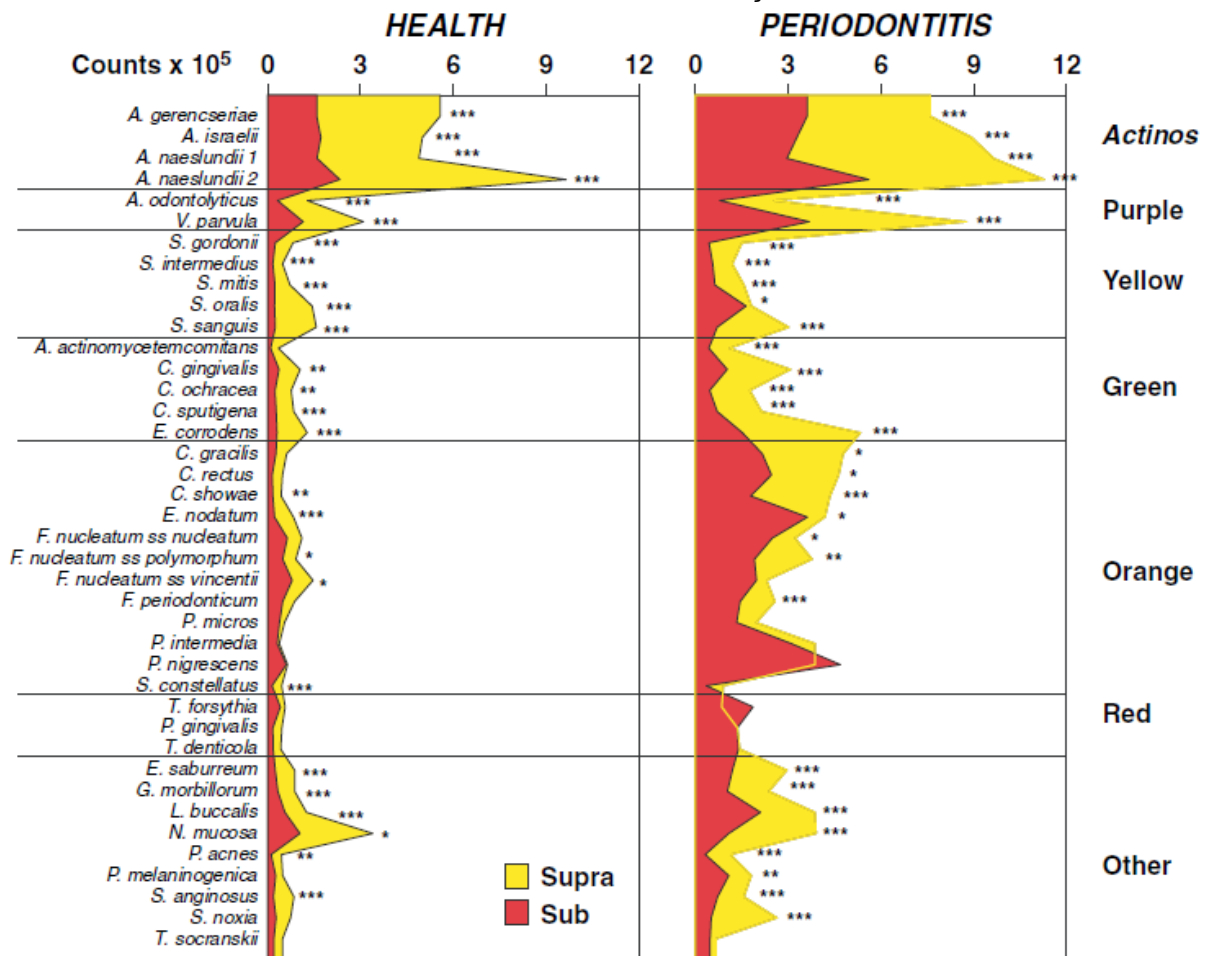
colonização bacteriana por meio da presença de bolsas periodontais (FIGURA 5). (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005; TELES et al., 2013).

FIGURA 4 DIFERENÇAS NA COMPOSIÇÃO DO BIOFILME SUBGENGIVAL EM PACIENTES SAUDÁVEIS X PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL



DESCRIÇÃO DA FIGURA: Perfil microbiano presente na placa subgengival de 185 pacientes periodontalmente saudáveis (Cor Clara) comparado com 592 indivíduos com periodontite crônica (Cor escura). O perfil é derivado da contagem média de cada espécie em ambos os grupos. Diferenças estatísticas para cada espécie entre os grupos foi determinada utilizando os seguintes testes: Teste de Mann-Whitney Teste ajustado para múltiplas comparações: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. FONTE: SOCRANSKY e HAFFAJEE (2005)

FIGURA 5 DIFERENÇAS NAS CONTAGENS MÉDIAS DE BACTÉRIAS SUPRA E SUBGENGIVAIS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM DOENÇA PERIODONTAL



DESCRIÇÃO DA FIGURA: Perfil de 40 microrganismos presente na região sub e supragengival de 50 indivíduos saudáveis comparados com 89 portadores de doença periodontal crônica. * Representa diferença estatística significativa.

FONTE: SOCRANSKY e HAFFAJEE (2005)

2.9 ALTERAÇÕES DE MICROBIOTA E O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL

Tem aumentado a evidência na literatura de uma associação entre a microbiota residente e o desenvolvimento de malignidades. (MEURMAN; UITTAMO, 2008; SCHWABE; JOBIN, 2013; MICHAUD; IZARD, 2014). O caso mais bem explorado é da associação entre o *Helicobacter pylori* e o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico. (CORREA; HOUGHTON, 2007; ROKKAS et al., 2010; TANAKA, 2014). Além disso, microrganismos tais como o *Streptococcus bovis*, *Chlamydia trachomatis* e *Fusobacterium nucleatum* (bactérias comuns da boca) tem sido associadas com o carcinoma do cólon, (ELLMERICH et al., 2000), câncer cervical, (WALLIN et al., 2002) e carcinoma colorretal (JALALI et al., 2014). A

presença desses microrganismos nem sempre estão diretamente relacionados com a causa da doença. Em alguns casos sugere-se a hipótese que o crescimento do tumor poderia ser inicialmente dependente da bactéria para estimular o sistema imune, porém em estágios posteriores ele não requereria a sua presença para continuar proliferando. (RAJEEV et al., 2012). Diversos mecanismos foram propostos de como as bactérias podem estar envolvidas nos processos de transformações malignas. No entanto os principais seriam: Persistência de inflamação crônica local ocasionada pela secreção de citocinas inflamatórias ou dano direto ao DNA por meio dos metabólitos produzidos pelas bactérias. Algumas bactérias produzem como produto final o aldeído, esse composto é um carcinógeno bem descrito na literatura. Além disso, as bactérias podem produzir espécies reativas do oxigênio e nitrogênio capazes de interagir com a camada lipoproteica celular causando um dano direto ao núcleo celular. (MEURMAN, 2010; FELLER et al., 2013; SCHWABE, JOBIN, 2013).

A higiene oral, o uso de antibióticos e imunossupressores, a quimioterapia e radioterapia antineoplásicas podem causar modificações na composição da microbiota bucal e causar alterações ainda desconhecidas. (HEIMDAHL et al., 1989; JONES et al., 1992; SARAIVA et al., 2006; MEURMAN, 2010; AMES et al., 2012; RAJEEV et al., 2012). Uma revisão sistemática de literatura investigou a relação entre a presença da doença periodontal e o desenvolvimento de câncer bucal. Os autores concluíram que pode ser plausível essa associação, dos dozes estudos avaliados na revisão, 9 deles correlacionaram positivamente a presença de doença periodontal e o câncer. (JAVED; WARNAKULASURIYA, 2015). Os dados sugerem que a doença periodontal pode ser considerada um fator de risco e que ela exerce uma ação sinérgica com o tabaco e álcool. (MEISEL et al., 2012).

Na boca, bactérias como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis* são as principais sintetizadoras de aldeído. (KURKIVUORI et al., 2007; MEURMAN; UTTAMO, 2008; RAJEEV et al., 2012; WANG; GANLY, 2014). O aldeído é um composto que apresenta alta toxicidade em pacientes com AF. Altas concentrações desse composto no meio intracelular é um dos principais responsáveis pela falha na produção de células progenitoras da medula óssea. (LANGEVIN et al., 2011; ROSADO et al., 2011).

Pacientes com câncer bucal apresentaram maiores concentrações salivares de *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus mitis*

(MAGER et al., 2005) quando comparados com um grupo controle. Diferenças de microbiota também foram encontradas em um estudo com amostras de tecidos neoplásicos. (PUSHALKAR et al., 2012). Recentemente, por meio da técnica de sequenciamento genético, pesquisadores encontraram diferença no perfil microbiano salivar de pacientes com CCE bucal, CCE orofaríngeo e controles saudáveis. Bactérias do gênero *Streptococcus*, *Prevotella*, *Haemophilus*, e *Veillonella* foram mais abundantes nos casos de CCE. (GUERRERO-PRESTON et al., 2016). No entanto a relação de causa e efeito não pode ser estabelecida devido à dificuldade de acompanhamento longitudinal dos casos.

Um relato de caso de câncer bucal em um paciente com AF identificou a presença elevada do *Mycoplasma salivarium*. Os autores sugerem que essa bactéria deve ser investigada, visto que ela não é uma colonizadora comum na boca de pacientes saudáveis. (HENRICH et al., 2014). Outros 3 estudos que descrevem microrganismos presentes no meio bucal de pacientes com AF. O primeiro compara a concentração de *Lactobacillus* sp e *Streptococcus mutans* em pacientes transplantados versus não transplantados pela técnica de cultura. Os autores não encontram diferença na concentração de microrganismos entre os grupos. (YALMAN et al., 2001). Com o emprego da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase); foi verificado a presença de 4 bactérias periodontopatogênicas (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola*) na microbiota salivar de 35 indivíduos com AF. Não foi encontrada diferença estatística na identificação dessas bactérias na microbiota salivar dos participantes quando comparados ao grupo controle. (LYKO et al., 2013). E por fim, um relato de caso que descreveu a microbiota periodontal presente na boca de um paciente com periodontite agressiva. (NOWZARI et al., 2001).

2.10 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL

A cultura de microrganismos em laboratório foi por muito tempo a principal técnica de identificação de bactérias presentes no meio bucal. Acreditava-se que todas as espécies podiam crescer *in vitro*. No entanto existem algumas espécies bacterianas que nunca foram cultivadas em laboratório. (DEWHIRST et al., 2010; POZHITKOV et al., 2011). Atualmente a técnica de cultura é empregada para

identificar a susceptibilidade de um patógeno a antibióticos e verificar a sua patogenicidade. (SOCRANSKY et al., 1998; TELES et al., 2006, 2013).

Socransky et al. em 1994, propuseram uma técnica chamada *Checkerboard DNA-DNA hybridization* que analisa genomas bacterianos inteiros por meio de sondas de DNA. Esse método tem capacidade de hibridizar mais de 40 espécies bacterianas simultaneamente. (SOCRANSKY et al., 1998). No entanto a sua limitação consiste na não identificação de novas espécies bacterianas, visto que somente as bactérias com sondas preparadas previamente são identificadas. (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

Com o emprego da biologia molecular e as técnicas de sequenciamento, a identificação de novas espécies bacterianas tem avançado. (DEWHIRST et al., 2010). O sequenciamento permite a identificação de uma grande quantidade de espécies em uma única análise, com um período curto de tempo e custo reduzido. (CAPORASO et al., 2012).

2.10.1 Técnicas de sequenciamento genético bacteriano

O gene 16S rRNA apresenta 9 regiões hipervariáveis (FIGURA 5), e com o sequenciamento de apenas um fragmento é possível realizar a taxonomia bacteriana com uma acurácia de até 99%. (LIU et al., 2012). De maneira geral o DNA da amostra é extraído, purificado e amplificado de acordo com a região do gene escolhida. Em seguida, as leituras geradas são comparadas com bibliotecas genômicas disponíveis em domínio público. Para as bactérias da boca existe um banco de dados chamado “*Human Oral Microbiome Database*” no qual cerca de 54% das bactérias já estão nominadas e passíveis de identificação por meio da sequência genética gerada. (CHEN et al., 2010).

FIGURA 6 REPRESENTAÇÃO DO GENE 16S rRNA BACTERIANO

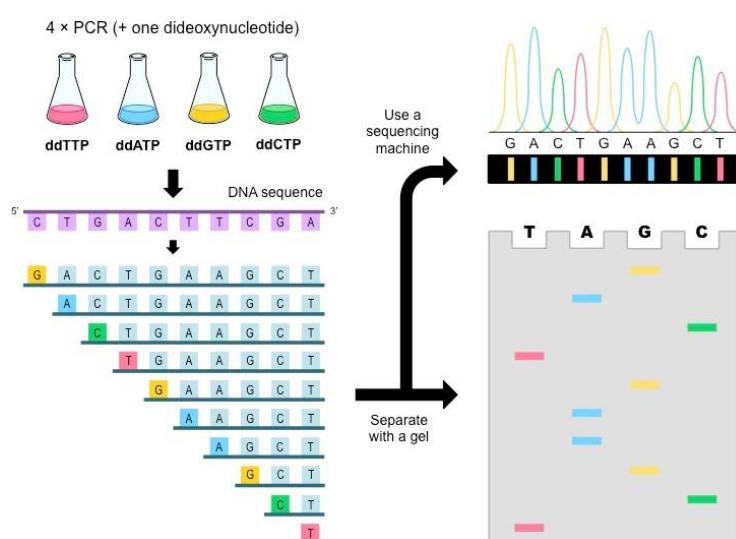


DESCRIÇÃO DA FIGURA: Verde: regiões não variáveis entre os grupos bacterianos. Cinza: regiões hipervariáveis utilizadas para sequenciamento.

FONTE: ALIMETRICS (2016).

O primeiro organismo a ter o seu material genético totalmente sequenciado foi o fago lambda 174 descrito pelo bioquímico Frederick Sanger em 1970. O método (Técnica de Sanger) descrito por esse pesquisador contribuiu para a identificação de diversas espécies de novos microrganismos e para o avanço do projeto genoma. (MORENO, 2013). Em 1986 foi lançado no mercado o primeiro sequenciador automático de DNA, o ABI 370, e em 1998 o primeiro sequenciador de eletroforese capilar, o ABI 3700. A técnica consiste na fragmentação do DNA e adição de dideoxynucleotídeos (ddNTPS) que são nucleotídeos com terminações modificadas. Essas terminações possuem fluoróforos, que depois de submetidos à eletroforese de alta resolução em tubos capilares irão gerar produtos separados por tamanho. Além disso, quando estes fragmentos saem dos tubos capilares eles passam por um detector de laser que irá excitar os fluoróforos e produzir fluorescência em quatro cores diferentes, no qual cada nucleotídeo é representado por uma cor. A leitura é realizada por um software que irá revelar a sequência de DNA na forma de gráficos (FIGURA 6) . A técnica de Sanger possui a vantagem de gerar leituras longas (aproximadamente 1000 pares de bases (pb)) o que garante uma alta acurácia na identificação bacteriana (99%), Entretanto, a técnica requer diversas etapas de trabalho, apresenta um custo elevado e gera um número limitado de leituras. (KIRCHER; KELSO, 2010).

FIGURA 7 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA DE SANGER



DESCRIÇÃO DA FIGURA: Nucleotídeos marcados por fluoróforos que emitem luz são adicionados a uma amostra. Cada base é representada por uma cor que ao passar pelo sequenciador irá emitir um sinal que é lido pelo aparelho. Ao final cada base é separada no aparelho pelo seu comprimento e peso.

FONTE: BIONINJA (2016)

Atualmente os sequenciadores de nova geração (*Next generation sequencing-NGS*) geram milhares de leituras em apenas uma corrida de sequenciamento com tempo reduzido. (KIRCHER; KELSO, 2010). Os aparelhos mais utilizados são o 454 da empresa Roche e os sequenciadores da plataforma Illumina. (MARDIS, 2008; CHEN; JIANG, 2014). Ambos utilizam o método de sequenciamento em paralelo. Esse método permite a leitura imediata dos ddNTPS enquanto a cadeia ainda está em extensão e não é necessário a etapa de clonagem *in vivo* como requeria a técnica de Sanger. Para isso, uma biblioteca genética é preparada *in vitro* e o DNA é amplificado por ponte sem necessidade de clonagem. (KIRCHER; KELSO, 2010).

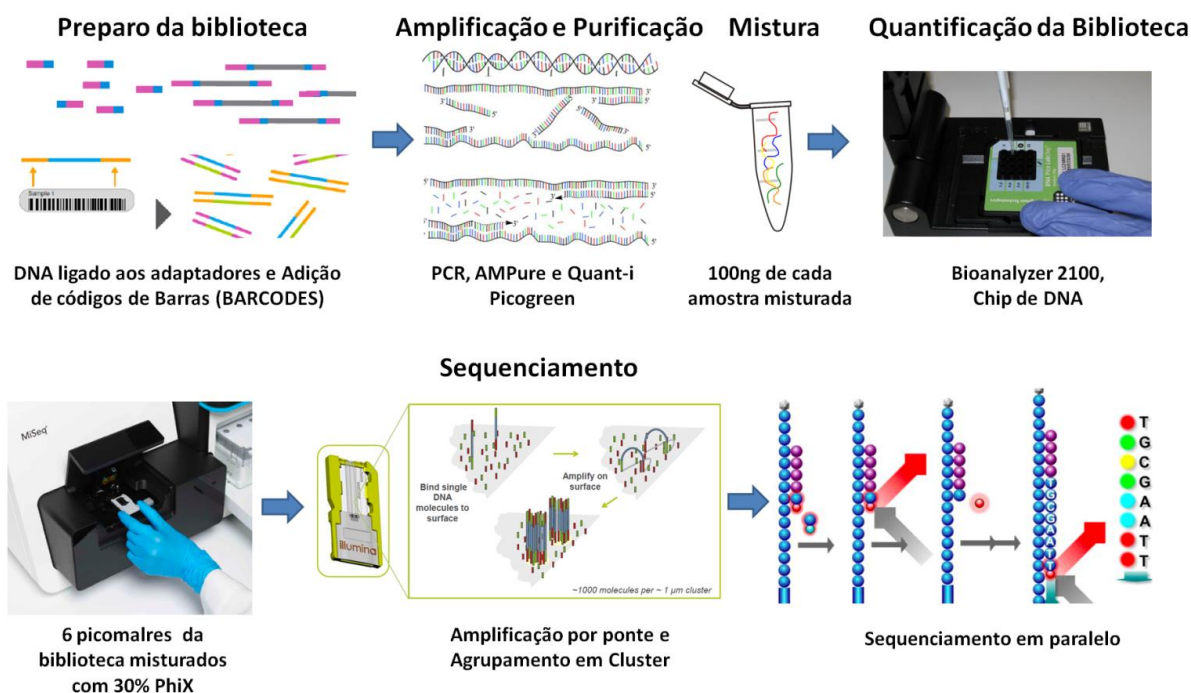
Para exploração da diversidade microbiana da boca e identificação de microrganismos ainda desconhecidos, o instrumento Miseq da plataforma Illumina é frequentemente recomendado e há relatos de diversos estudos com o emprego desse aparelho. (LAZAREVIC et al., 2009; CHEN; JIANG, 2014; SCHMIDT et al., 2014; ZHENG et al., 2015; OTU et al., 2016; GUERRERO-PRESTON et al., 2016). Quando o aparelho de pirosequenciamento 454 da Roche é comparado com o aparelho Miseq da Illumina; ele apresenta a vantagem de gerar leituras com maior número de pares de base (até 800 pb x 300pb). No entanto, o Miseq da Illumina gera uma maior quantidade de leituras, o que compensa a menor quantidade de pares de base. (KIRCHER; KELSO, 2010; FREY et al., 2014; MIYAMOTO et al., 2014). Além de maior quantidade leituras, o instrumento da Illumina tem um custo até 10 vezes menor por base analisada, alto desempenho e acurácia semelhante aos resultados produzidos na plataforma da Roche. (LIU et al., 2012; CHEN; JIANG, 2014).

2.10.1.1 Sequenciamento Miseq Illumina

O conceito de sequenciamento dessa plataforma é semelhante ao proposto por Sanger. No entanto, após o estágio de parada com a incorporação de uma base, o sinal fluorescente emitido apresenta um resultado imediato. Em seguida, a reação reinicia e ocorre a incorporação de uma nova base. No método de Sanger, o resultado da leitura é apresentado após o final do sequenciamento. (KIRCHER; KELSO, 2010).

Para que o sequenciamento ocorra, é necessário que as sequências a serem determinadas sejam convertidas em uma biblioteca genômica (coleção de fragmentos de DNA obtidos de uma determinada amostra). Para a construção dessa biblioteca, o DNA da amostra é extraído, quantificado. Em seguida, são adicionados adaptadores que se ligam às extremidades do DNA para promover a amplificação. A etapa de amplificação gera milhões de pequenas cópias do DNA que se agrupam em clusters e em seguida essa biblioteca é qualificada. (FIGURA 7). Quanto maior a quantidade e tamanhos dos clusters gerados, melhor será a qualidade da biblioteca. Durante o sequenciamento as bases marcadas vão sendo incorporadas aos fragmentos por síntese e a emissão de fluorescência acontece simultaneamente. Com os sistemas mais modernos, cada cluster pode gerar até 300 pb. (KIRCHER; KELSO, 2010; FREY et al., 2014). Por fim, as leituras geradas são organizadas, refinadas pela equipe de bioinformática e comparadas com as bibliotecas genômicas já existentes; permitindo assim a taxonomia bacteriana. (CHEN et al., 2010).

FIGURA 8 ESQUEMA REPRESENTANDO AS ETAPAS DE SEQUENCIAMENTO ILLUMINA.



Fonte: O Autor (2016)

NOTA: Imagens retiradas do site da plataforma ILLUMINA (2016).

Como todas as outras técnicas de mensuração de microrganismos, o sequenciamento também apresenta algumas limitações. A técnica não é totalmente

quantitativa e gera uma enorme quantidade de leituras que podem conter erros. No entanto, essa ferramenta tem se demonstrado importante para o conhecimento da diversidade bacteriana presente na boca em especial das espécies ainda não cultivadas. (POZHITKOV et al., 2011).

3 METODOLOGIA

3.1 APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde e do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o número de parecer 1.219.800. (ANEXO 1). Foi também aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade da Carolina do Norte de Chapel Hill sob o parecer número 15-2381 (ANEXO 2). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado pelo próprio paciente quando este era maior de idade (APÊNDICE 1) ou pelo responsável legal da criança (APÊNDICE 2). Conforme a solicitação do CEP/HC/UFPR, para os adolescentes com 12 anos de idade ou mais, foi elaborado o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (APÊNDICE 3).

3.2 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional transversal e a amostra foi composta por conveniência.

3.3 AMOSTRA

Participaram desse estudo, pacientes com AF que estavam presentes no IV Encontro Nacional de pacientes com Anemia de Fanconi realizado em Curitiba/PR em dezembro de 2015.

3.3.1 Critérios de Inclusão

Ter o diagnóstico de AF e não apresentar alterações físicas ou sistêmicas que impedissem a coleta de saliva e um exame visual na boca.

3.3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os participantes que não responderam ao questionário adequadamente e/ou aqueles que não realizaram alguma etapa do protocolo tais como coleta de saliva e exame visual da boca.

3.4 COLETA DOS DADOS

Aqueles participantes que aceitaram fazer parte do estudo responderam a um questionário (APÊNDICE 2) dividido em três partes (1-Dados sócio-demográficos, 2-Hábitos de saúde bucal, 3- Autorrelato de saúde bucal). O Autorrelato de saúde bucal foi traduzido e adaptado do modelo proposto por Ecke et al (2012). Informações relacionadas ao transplante e saúde sistêmica foram retiradas do prontuário médico. O questionário foi aplicado por um único pesquisador previamente treinado.

A idade, o TCTH, histórico de DECH e / ou mucosite oral e presença de LPM têm sido propostos como fatores de risco para o desenvolvimento CCE na boca de pacientes com AF. (BONFIM et al, 2016). Assim, os indivíduos foram classificados em três grupos de risco. Alto risco: Aqueles com mais de 5 anos de transplante ou ≥ 18 anos de idade com presença de LPM; Risco moderado: < 18 anos com LPM ou > 18 anos sem LPM; Baixo risco: < 18 anos sem LPM e transplante menor que 5 anos.

3.5 COLETA DE SALIVA E ANÁLISE

Após responder ao questionário, o paciente dirigiu-se a um espaço reservado para a coleta de saliva. Ele recebeu orientações prévias quanto a não ter se alimentado ou escovado os dentes uma hora antes da coleta. O pesquisador forneceu um copo com gelo convencional contendo um tubo do tipo Falcon de 50ml. O participante proveu 2 ml de saliva não estimulada por um tempo máximo de coleta de até 15 minutos. Imediatamente após a coleta, a saliva foi alíquotada e transferida

para criotubos vazios identificados. Os criotubos foram colocados em uma placa termocondutora e acondicionados em uma caixa (*Cool Box*) contendo gelo seco para o imediato congelamento das amostras. Ao final do dia o material foi transferido para um freezer -80°C . Após dois meses, um criotubo de 500 μl de cada paciente foi acondicionado em uma caixa de isopor contendo gelo seco e enviado para análise no Laboratório da Universidade da Carolina do Norte de Chapel Hill nos Estados Unidos.

3.6 EXAME INTRABUCAL

O exame intrabucal foi realizado por um único dentista previamente treinado com o auxílio de espelho clínico nº 5, luz artificial, fio dental e gaze. Os achados clínicos foram anotados em uma ficha clínica desenvolvida para o estudo. (APÊNDICE 3).

Para avaliar a condição de saúde bucal dos participantes foram utilizados os seguintes parâmetros clínicos:

- A) CPO-D (WHO, 1994): Para medir a experiência de cárie, todos os dentes foram classificados como hígido, cariado, perdido ou obturado.
- B) Índice de Placa Visível (IPV) - (AINAMO & BAY, 1976): Foi definida como ausência ou presença de biofilme supragengival visível. Foram analisadas seis superfícies por dente (mésio-vestibular, disto-vestibular, vestibular, mésio-lingual, disto-lingual e lingual). O resultado final foi o percentual de números de sítios com biofilme dos dentes índices (16,11,26,46,31,36).
- C) Índice de sangramento gengival (ISG) (CARTER; BARNES, 1974): Com o auxílio do fio dental, foi determinado presença ou ausência de sangramento quando este ocorria até 10 segundos após o examinador ter passado o fio na face mesial ou na face distal de todos os dentes presentes na arcada. O resultado final foi o percentual do número sítios com sangramento gengival.
- D) Avaliação da integridade das mucosas: Foram anotadas todas as LPM tais como úlcera, nódulo, leucoplasia e eritroplasia.

Ao final da avaliação intrabucal, todos os pacientes receberam informações referentes aos achados clínicos, um kit de higiene bucal e panfletos educativos (ANEXO 2).

3.7 ANÁLISE LABORATORIAL SALIVAR

Foi realizada a identificação da diversidade microbiana presente na amostra de saliva de pacientes com AF por meio da técnica de sequenciamento genético. O processamento e análise das amostras foram realizados por uma equipe de laboratório com experiência prévia em análise salivar de pacientes com essa doença.

3.7.1 Extração do DNA e preparo das amostras para sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA foi extraído com o KIT *MasterPure DNA Purification* (Epicentre, Illumina, Madison, WI) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram descongeladas e resuspendidas. Após, foi transferido 150 µl da amostra para um tubo e adicionado 150 µl de T 2x e solução de lise C Lysis contendo proteinase K e colocado na microcentrifugadora. Essa mistura foi encubada a uma temperatura de 65° C por 15 minutos sendo agitada no vortex a cada 5 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas na mesma temperatura por mais 30 minutos com adição de 1 µl de 5 µg / µl RNase. Uma incubação noturna a 37°C com lisozima (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) foi incluída ao processo de extração para garantir que as bactérias Gram positivas fossem identificadas. Ao final as amostras foram colocadas em gelo por 5 minutos e em seguida o DNA foi precipitado. Após as etapas de precipitação, o DNA foi resuspendido em 5 µl de solução tampão TE.

O DNA foi quantificado e qualificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 DNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) na relação 260/280 e 260/230. Para a amplificação e preparo da biblioteca foi utilizado o protocolo proposto por Caporaso et al. (2011). A amplificação foi realizada utilizando 50 ng de DNA total. A região alvo da hipervariável do gene 16S rRNA foi a V3-V4. Os *primers* utilizados foram: *forward* 341 AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGTC

CTACGGGAGGCAGCAG e *reverse* 806 CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGATNNNNNNNNNNNAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT, no qual NNNNNN NNNNNN é um código de barras identificador GoLay composto por 12pb. (CAPORASO et al., 2012). O ciclo iniciou com uma desnaturação a 94 ° C durante 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 ° C durante 45 segundos, emparelhamento a 50 ° C durante 1 minuto, alongamento a 72 ° C durante 1,5 minutos e uma etapa de extensão final a 72 ° C durante 10 minutos. O tamanho do fragmento foi de aproximadamente 590 pb.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando esferas AMPure (Beckman Coulter, Brea, CA) e quantificadas utilizando o Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific division, Waltham, MA). Quantidades equimolares (100ng) de cada biblioteca foram reunidas, purificadas em gel de agarose, analisadas e quantificadas no aparelho Bioanalyzer 2100. Esse instrumento utiliza um chip de DNA de alta sensibilidade para mediar a quantidade e qualidade de DNA presente na biblioteca (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

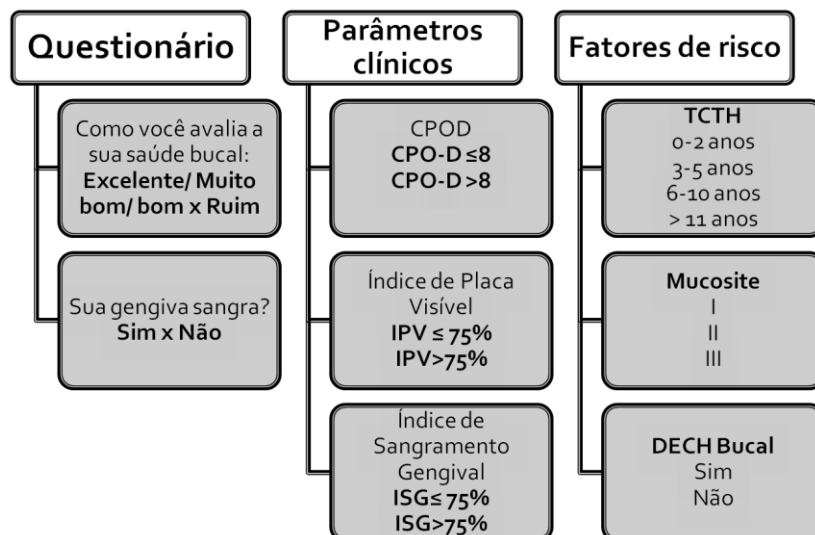
Seis picomolares da biblioteca foram misturadas com 30 % PhiX e corridas no instrumento MiSeq (Illumina, San Diego, CA). O sequenciamento final pareado e a geração de clusters automatizados foram obtidos utilizando os reagentes do Kit de 500 ciclos seguindo as recomendações do fabricante.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após remover as sequências quiméricas e aquelas que não passaram no controle de qualidade, as leituras foram avaliadas utilizando o QIIME analysis pipeline (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, qiime.org, version 1.8) (Caporaso et al. 2010). As leituras foram agrupadas em Unidades Operacionais taxonômicas (Otu) usando UCLUST (Edgar, 2010) e a taxonomia bacteriana foi determinada utilizando Greengenes. Depois da atribuição taxonômica, OTUs foram combinados com os dados da amostra. A abundância relativa de OTUs foi analisada em nível de filo e gênero. Todos os dados coletados em questionários foram tabulados em um banco de dados por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0. A variável desfecho (Perfil microbiano) foi comparado com as variáveis relacionadas ao perfil de saúde e risco para o

desenvolvimento de CCE (FIGURA 8). Foram utilizados modelos lineares, testes de correlação, qui-quadrado e exato de Fisher. As análises multivariadas foram ajustadas para o FDR (Taxa de falsas descobertas).

FIGURA 9 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE INTERESSE



FONTE: O Autor (2016)

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS SÓCIODEMOGRÁFICAS E COMPORTAMENTAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Um total de 97 pacientes esteve presente no IV Encontro Brasileiro da anemia de Fanconi, sendo que 64 deles aceitaram participar da pesquisa. Três indivíduos foram excluídos; dois não responderam ao questionário e um não realizou a coleta de saliva. A amostra total foi composta por 61 participantes. A média de idade (\pm DP) foi de 22 (\pm 7,6) anos (mín. 11; máx. 44), sendo a maioria deles do sexo masculino (57,4%). Além disso, 30% da população adulta (≥ 18 anos de idade) não haviam completado o ensino médio e 63,3% dos participantes tinham uma renda mensal familiar \leq R\$ 1.500,00. Mais detalhes sobre as características sociodemográficas estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DOS PARTICIPANTES (n=61)

		Alto risco	Moderado e Baixo		Total	
Características sociodemográficas		83.6% (n=51)	16.4% (n=10)	p valor	Mediana (Intervalo)	100% (n=61)
Idade	Mediana em anos (Intervalo)	22 (11-44)	16 (11-40)	***0.010	21 (11-44)	100% (n=61)
Gênero	Masculino	47.5% (29)	9.8% (6)	**0.57		57.4% (35)
	Feminino	36.1% (22)	6.6% (4)			42.6% (26)
Estado civil	Casado	60.7% (37)	13.1% (8)	**0.479		73.8% (45)
	Solteiro	23.0% (14)	3.3% (2)			26.2% (16)
Etnia	Branco	41% (25)	8.2% (5)	*0.955		49.2% (30)
	Não branco	42.6% (26)	8.2% (5)			50.8% (31)
Nível Educacional	Ensino fundamental	37.7% (23)	11.5% (7)	**0.38		49.2% (30)
	Ensino médio	36.1% (22)	3.3% (2)			39.3% (24)
	Graduação	9.8% (6)	1.6% (1)			11.5% (7)
Profissão	Estudante	31.1% (19)	8.2% (5)	**0.51		39.3% (24)
	Trabalha	24.6% (15)	1.6% (1)			26.2% (26)
	Não trabalha	27.9% (17)	6.6% (4)			34.4% (21)
†Renda familiar mensal	≤ R\$ 1500,00	53.3% (32)	10% (6)	**0.539		63.3% (38)
	> R\$ 1500,00	30% (18)	6.7% (94)			36.7% (22)
†Renda familiar mensal per capita	Média (Intervalo)	R\$ 438,24 (R\$ 38,92- R\$ 3.336,96)	R\$ 519,08(R\$ 175,32- R\$ 3.336,96)	***0.758	R\$ 452,56 (R\$ 38,92- R\$ 3.336,96)	98.3% n=60

FONTE: O Autor (2016)

NOTA: * Teste qui-quadrado; ** Teste exato de Fisher; *** Teste U Mann-Whitney; p valores em negrito: p<0.05; † Dados ausentes.

4.2 PARÂMETROS DE SAÚDE BUCAL

Todos os participantes (n=61) relataram ter uma escova de dente individual, 75% (n=46) deles declararam trocar a escova com menos de 3 meses e 60% (n=37) visitar um dentista a cada 6 meses. Vinte e oito (46%) faziam uso do fio dental com uma mediana de 4 vezes na semana e 13 (21%) utilizavam bochechos com uma média semanal de 7 vezes. Vinte e três pacientes (37,3%) relataram ter sangramento gengival, principalmente durante a escovação (82,6%) (n=19), no entanto somente 9 (14,8%) acreditavam ter alguma doença na gengiva. Além disso, 51% (n=31) deles classificaram a sua saúde bucal como "muita boa ou boa" e apenas 5% (n=3) como "ruim". Com relação à saúde periodontal, 11,5% (n=7) da população relatou ter a sensação de um ou mais dos seus dentes "moles", e 22% (n=13) relataram ter "raízes expostas". O exame clínico intrabucal indicou que a média do IPV foi de 31,3% (\pm 27,1%; mediana: 25%) e que o ISG foi de 34,2% (\pm 25,9%, mediana: 26,9%). O CPO-D médio foi de 5,3 (intervalo: 0 - 25, mediana: 4) sendo que, 12 pacientes apresentaram CPO-D = 0 (TABELA 2).

TABELA 2 ESTADO DE SAÚDE BUCAL DOS PARTICIPANTES

		Alto risco	Moderado e Baixo		Total	
Estado de saúde bucal		83.6% (n=51)	16.4% (n=10)	p valor	Mediana (Intervalo)	100% (n=61)
Sangramento Gengival	Sim	32.8% (20)	4.9% (3)	**0.432		37.3% (23)
	Não	50.8% (31)	11.5% (7)			62.3% (38)
Quando a gengiva sangra	Escovação	73.9% (17)	8.7% (2)	**0.16		82.6% (19)
	Espontaneamente	0	4.3% (1)			4.3% (1)
	Outro	13% (3)	0			13% (3)
Doença na gengiva	Sim	14.8% (9)	0	**0.259		14.8% (9)
	Não	60.7% (37)	16.4% (10)			77% (47)
	Não sabe informar	8.2% (5)	0			8.2% (5)
Como avalia a saúde bucal	Excelente, Muito bom e Bom	50.8% (31)	11.5% (7)	**1.0		62.3% (38)
	Regular	27.9% (17)	4.9% (3)			32.8% (20)
	Ruim	4.9% (3)	0			4.9% (3)
Sente dente amolecido	Sim	11.55 (7)	0	**0.265		11.55 (7)
	Não	72.1% (44)	16.4% (10)			88.5% (54)
Sente a raiz exposta	Sim	18% (11)	3.3% (2)	**1.0		21.3% (13)
	Não	62.3% (38)	13.1% (8)			75.4% (46)
	Não sabe informar	3.3% (2)	0			3.3% (2)
CPO-D	Mediana (Intervalo)	4% (0-25)	4 (0-11)	***0.543	4 (0-25)	100% (61)
IPV	Mediana (Intervalo)	25% (0-100)	19.45%(2.8- 47.20)	***0.227	25% (0-100)	100% (61)
†ISG	Mediana (Intervalo)	27.4% (0-100)	20.4% (3.80-50)	***0.270	26.9% (0-100)	91.8% (56)

FONTE: O Autor (2016).

NOTA: Significância para os testes: ** Teste exato de Fisher; *** Teste U Mann-Whitney; † Dados ausentes.

LEGENDA: CPO-D: Cariado, perdido e obturado; IPV: Índice de placa visível; ISG: Índice de sangramento gengival.

4.3 FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO CCE BUCAL EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI

Trinta e oito (62,3%) indivíduos apresentaram LPM. A região de maior acometimento foi mucosa jugal (n=21), palato (n=19) e língua (n=17) e a leucoplasia foi a lesão de maior prevalência (n=35). Os pacientes mais velhos e com mais tempo de TCTH foram os que apresentaram maior prevalência de LPM ($p < 0,05$).

A média de idade diagnóstico da AF nos participantes do estudo foi de 13 anos (± 6 ; intervalo: 2-28 anos) sendo que, 86,9%(n=53) deles já haviam sido submetidos ao TCTH e apresentaram uma mediana de pós-transplante de 11 anos (± 6 ; intervalo: 1 -27 anos). Noventa e dois por cento dos participantes (n=49) apresentavam histórico de mucosite bucal. A DECH ocorreu em 56,6% (n=30) e a DECH bucal em 50,9%, (n=27) deles. Estes dados foram coletados do prontuário médico. Durante o exame da boca, somente dois (7,7%) pacientes apresentavam a

DECH bucal ativa. Vinte e sete (44,4%) deles relataram fazer uso de algum medicamento e em 5 (18,5%) casos a medicação foi o antibiótico.

O hemograma mais recente (dezembro de 2015) revelou uma mediana de neutrófilos e plaquetas de 3,134 / mm³ (\pm 1,620; intervalo: 460-7,560) e 217,000 / mm³ (\pm 98,000; intervalo: 24,000-468,000), respectivamente. Um pequeno número de pacientes apresentou valores de referência abaixo do padrão de normalidade. Quatorze deles (23%) apresentaram baixas contagens de plaquetas e 7 (11,5%) baixas contagens de neutrófilos sendo que dos quatorze, 8 (13%) não haviam sido transplantados. Em relação aos fatores de risco tais como tabaco e álcool, 2 (3%) declararam fumar e 6 (9,8%) relatavam ter parado. Um dos fumantes atuais declarou fumar 4 cigarros/dia durante 6 anos e um paciente declarou que foi fumante de 40 cigarros/dia durante cinco anos. Treze (21%) deles tinham histórico com o consumo de bebidas alcoólicas. Quanto aos grupos de risco, 51(83,6%) participantes foram classificados como alto risco; 7 (11,5%) em risco moderado e 3 (4,9%) deles no grupo de baixo risco. No entanto as comparações foram limitadas devido às disparidades na composição da amostra (TABELA 3).

4.4 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E PERFIL MICROBIOLÓGICO

O sequenciamento do gene 16S rRNA foi usado para avaliar a diversidade bacteriana das amostras de saliva de todos os participantes do estudo. Todas as amostras foram sequenciadas na mesma corrida e a média de leituras foi de 20,137 (\pm 24,731; mediana: 17,184), variando de 3,298 a 203,958 leituras. Uma amostra foi excluída da análise devido ao baixo número de leituras.

O sequenciamento revelou a presença de 13 filos bacterianos, no qual os filos *Firmicutes* (média \pm DP) (42,1% \pm 10,1%) e *Bacteroidetes* (25,4% \pm 11,4%) foram os mais predominantes. Em relação ao gênero, 82 tipos foram identificados e *Prevotella* (20,4% \pm 11,4%), *Veillonella* (18,18 % \pm 9,5%) e *Streptococcus* (18,15% \pm 9,4%) foram os que apresentaram maior abundância relativa. (GRÁFICO 1 e 2).

TABELA 3 DESCRIÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA O CCE EM PACIENTES COM AF

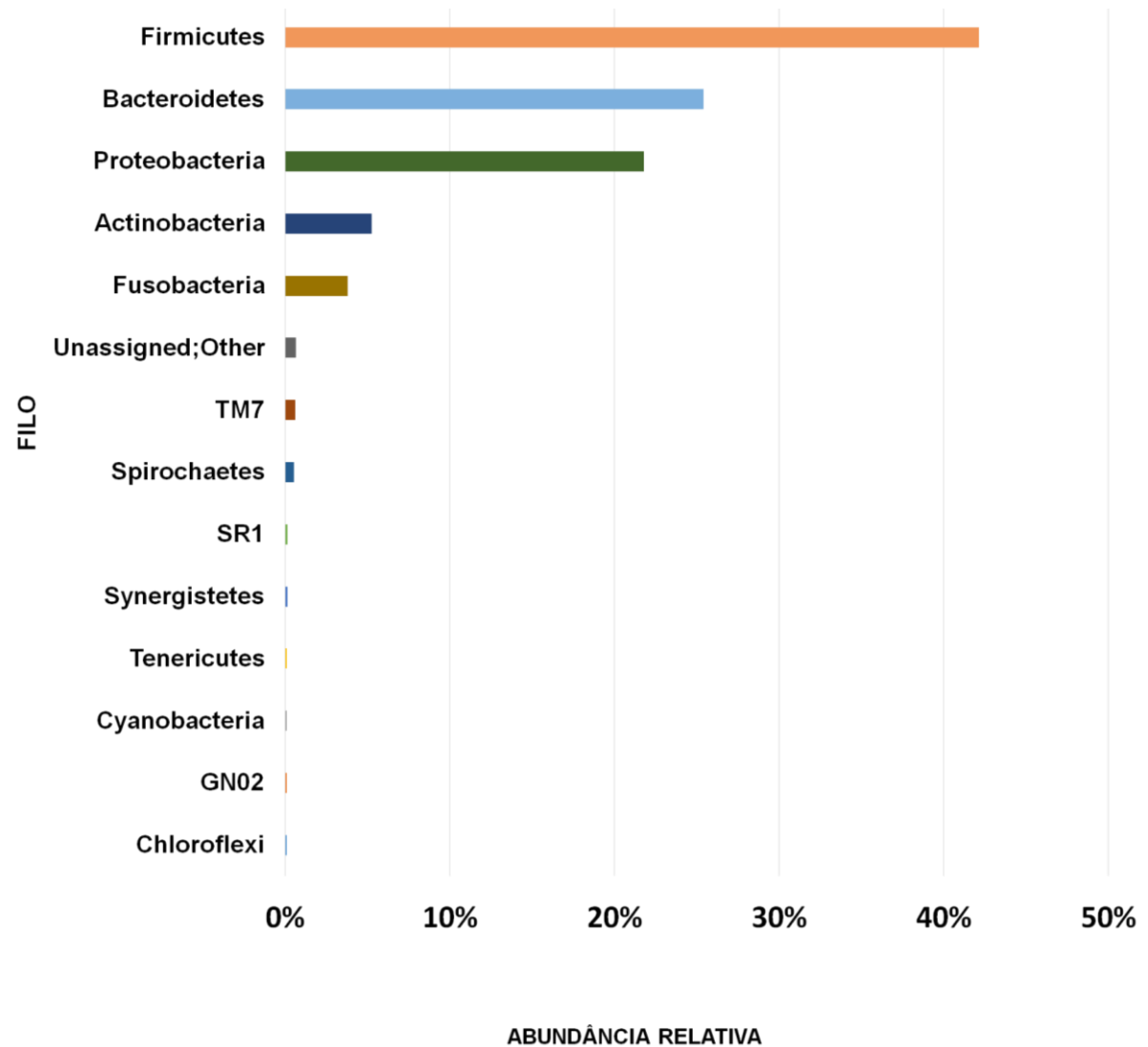
		Alto risco	Moderado e Baixo		Total
Fatores de risco para o câncer bucal		83.6% (n=51)	16.4% (n=10)	p valor	100% (n=61)
TCTH	Sim	80.3% (49)	6.6% (4)	**0.0001	86.9% (53)
	Não	3.3% (2)	9.8% (6)		13.1% (8)
Tempo de TCTH	Mediana (Intervalo)	11 (1-27) (49)	3 (2-4) (4)	***0.003	100% (53)
†Grau de mucosite	Grau 0	2% (1)	0.0%	**0.99	2% (1)
	≤ Grau II	28.6% (14)	2% (1)		30.6% (15)
	> Grau II	63.3% (31)	4.1% (2)		67.3% (33)
DECH sistêmica	Sim	50.9% (27)	5.7% (3)	**0.412	56.6% (30)
	Não	41.5% (22)	1.9% (1)		43.4% (23)
DECH bucal	Sim	45.3% (24)	5.7% (3)	**0.320	50.9% (27)
	Não	47.2% (25)	1.9% (1)		49.1% (26)
Lesão bucal	Sim	60.7% (37)	1.6% (1)	**0.0001	62.3% (38)
	Não	23% (14)	14.8% (9)		37.7% (23)
Neutrófilo	Mediana (Intervalo)	3,024/mm ³ (460-7,560)	1,349/mm ³ (593-4,972)	***0.017	100% (61)
Plaquetas	Mediana (Intervalo)	217,000/mm ³ (66,000-468,000)	91,500/mm ³ (24,000-247,000)	***0.002	100% (61)
Uso de Tabaco	Sim	1.6% (1)	0	**0.646	1.6% (1)
	Não	72.1% (44)	16.4% (10)		88.5% (54)
	Ex Fumante	9.8% (6)	0		9.8% (6)
Consumo de Álcool	Sim	18% (11)	0	**0.249	18% (11)
	Não	62.3% (38)	16.4% (10)		78.7% (48)
	Parou de beber	3.3% (2)	0		3.3% (2)

FONTE: O Autor (2016).

NOTA: Significância para os testes: ** Teste exato de Fisher; *** Teste U Mann-Whitney; † Dados ausentes; negrito valor de $p < 0.05$.

LEGENDA: TCTH: Transplante de células tronco hematopoéticas; DECH: Doença do enxerto contra o hospedeiro.

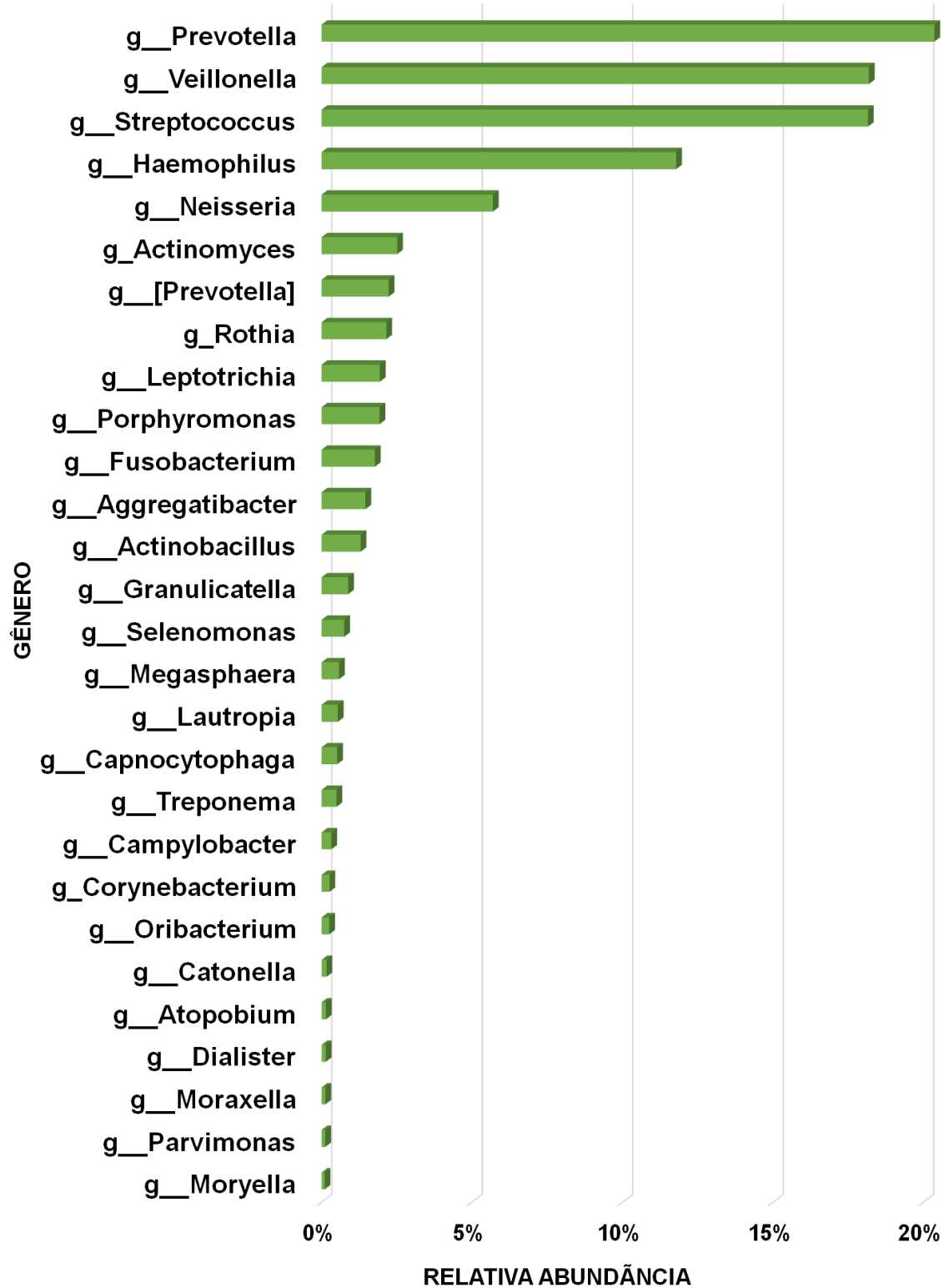
GRÁFICO 1 PERFIL MICROBIANO DA POPULAÇÃO EM NÍVEL DE FILO



DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando a abundância relativa dos filos bacterianos encontrados na saliva de 61 pacientes com AF.

FONTE: O Autor (2016)

GRÁFICO 2 PERFIL MICROBIANO EM NÍVEL DE GÊNERO



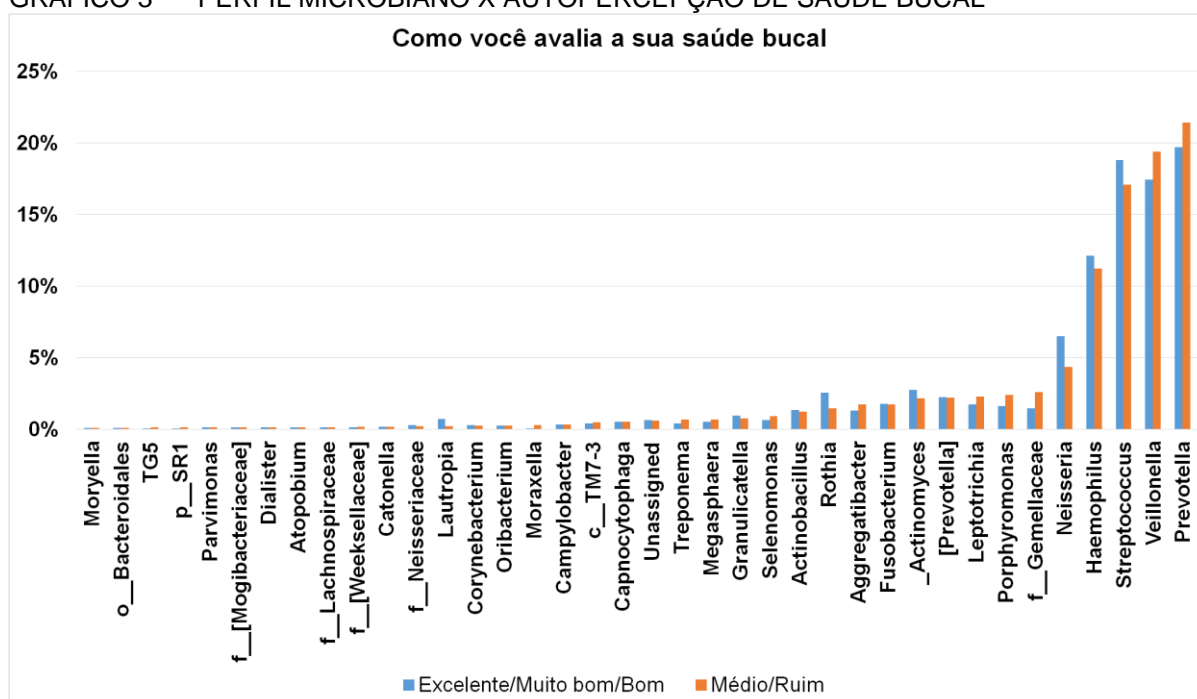
DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos com abundância relativa > 1% na saliva de 61 pacientes com AF.

FONTE: O Autor (2016).

4.5 PERFIL MICROBIANO ASSOCIADO AOS PARÂMETROS CLÍNICOS DE SAÚDE BUCAL

Algumas respostas obtidas no Autorrelato de saúde bucal foram correlacionadas com o perfil microbiano. Os pacientes que relataram ter uma saúde bucal ruim (n= 23) apresentaram maiores proporções de *Prevotella* (21,44% x 19,71%), *Veillonella* (19,39% x 17,45%) e *Porphyromonas* (2,41% x 1,63%), enquanto os que relataram ter uma saúde bucal excelente / muito bom / boa (n= 38) apresentaram níveis mais elevados de *Neisseria* (6,50% x 4,36%) e *Rothia* (2,56% x 1,47%). (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 PERFIL MICROBIANO X AUTOPERCEPÇÃO DE SAÚDE BUCAL

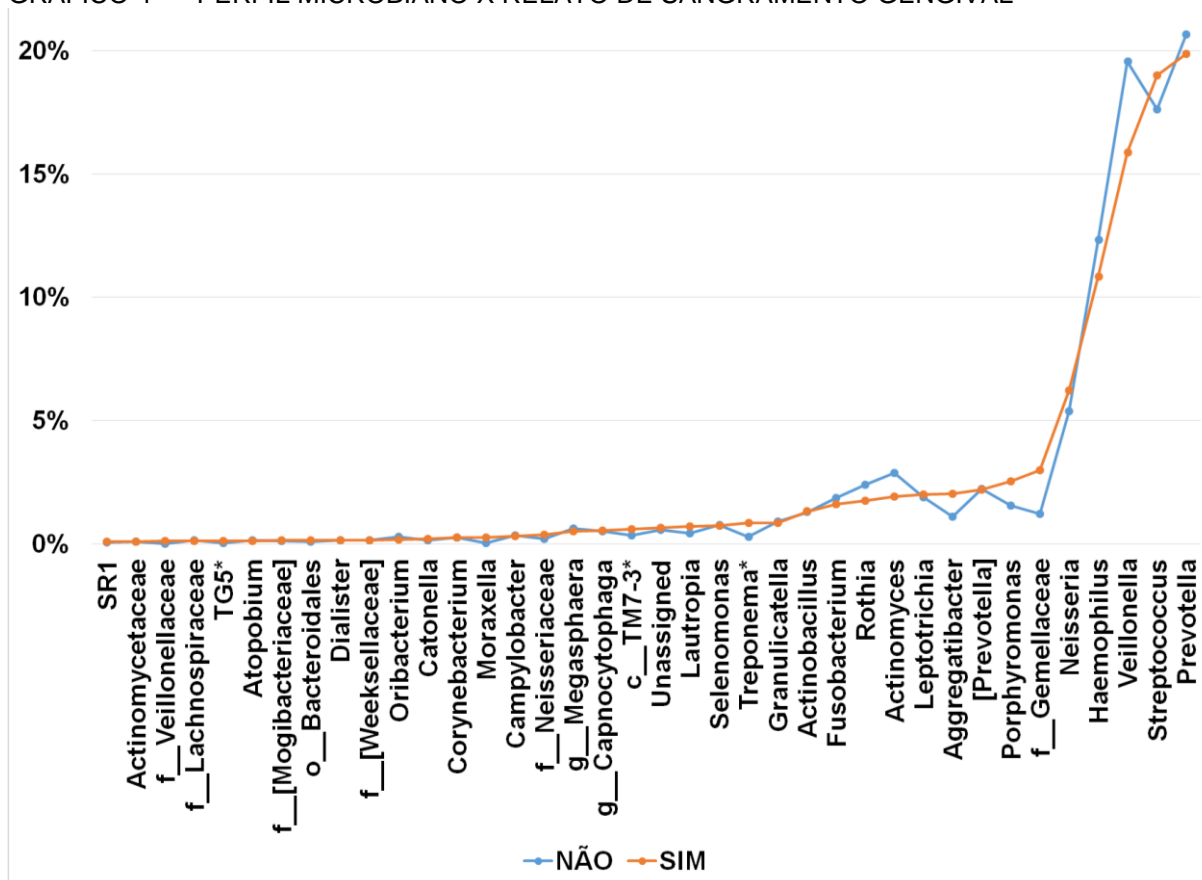


DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos com maior abundância relativa de acordo com a autopercepção em saúde bucal relatada pelos pacientes (n=61)

FONTE: O Autor (2016).

Os indivíduos que relataram sangramento gengival (n= 23) apresentaram proporções mais elevadas de *Treponema* (0,84% x 0,28%, p= 0,03), *Aggregatibacter* (2,02 x 1,1%) e *Porphyromonas* (2,55% x 1,54%), enquanto que aqueles que não relataram sangramento (n = 38) exibiram níveis mais elevados de *Veillonella* (19,57% x 15,89%), *Rothia* (2,40% x 1,75%) e *Actinomyces* (2,87% x 1,91%). (GRÁFICO 4). No entanto as diferenças não atingiram significância estatística quando ajustados para o FDR (Taxa de falsas descobertas).

GRÁFICO 4 PERFIL MICROBIANO X RELATO DE SANGRAMENTO GENGIVAL



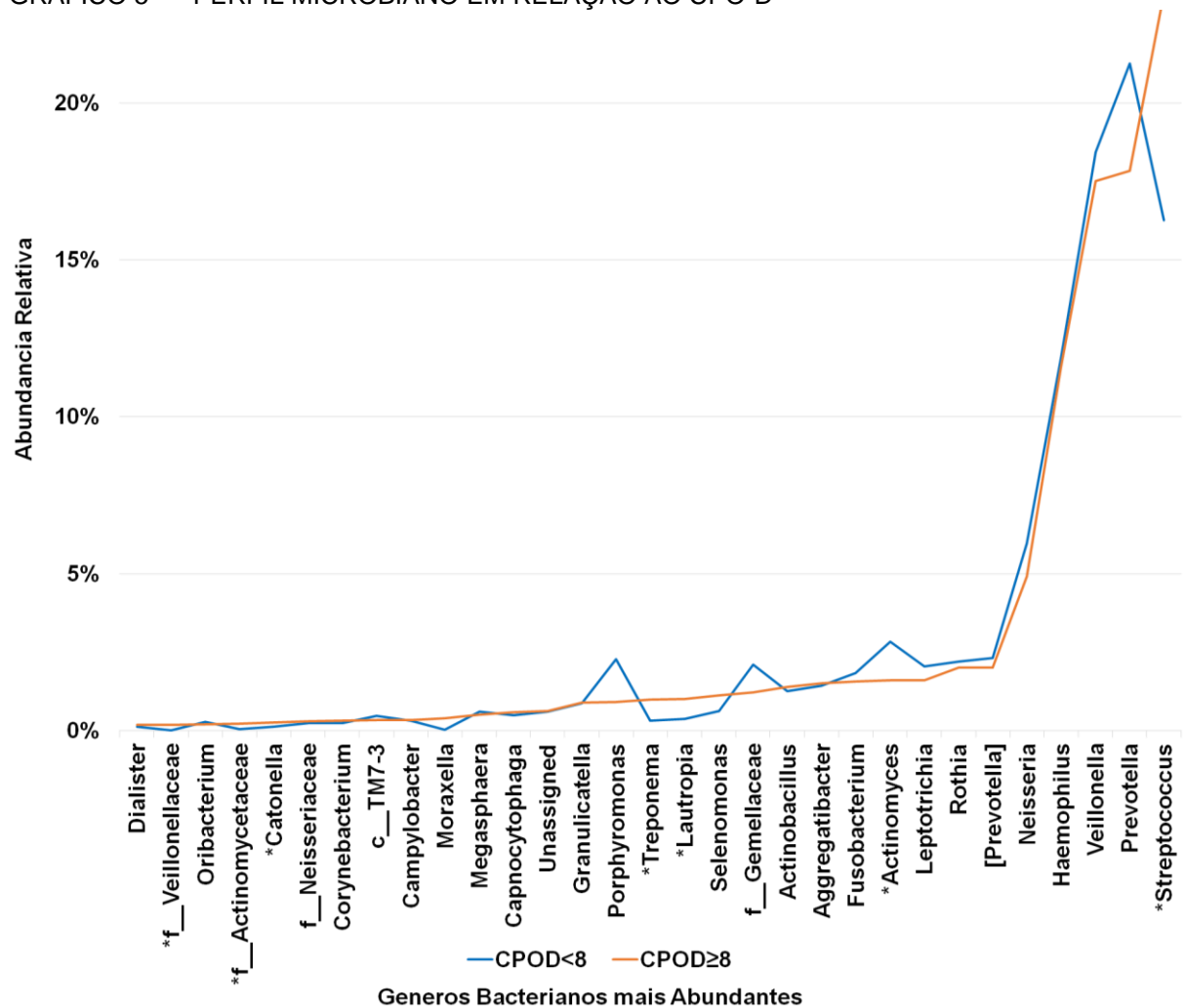
DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos com abundância relativa de acordo com o relato de sangramento gengival durante a escovação, alimentação e/ou espontâneo. FONTE: O Autor (2016).

Os índices de saúde bucal (CPOD, IPV e ISG) foram dicotimizados quanto ao seu perfil de distribuição. Os indivíduos que apresentavam CPOD >8 (n=16) tinham níveis mais elevados de *Streptococcus* (23,48% x 16,26%, $P = 0,007$), *Lautropia* (1,01% x 0,37%, $p = 0,04$) e *Treponema* (0,99% x 0,32%, $p = 0,01$) e aqueles com CPO <8 (n=45) apresentaram maiores proporções de *Prevotella* (21,26% x 17,83%), *Veillonella* (18,42% x 17,51%) e *Actinomyces* (2,83% x 1,61%, $p = 0,04$). (GRÁFICO 5).

Os participantes com percentil de placa ≥ 75 (n= 7) apresentaram maiores níveis de *Veillonella* (19,26% x 17,80%, $p = 0,05$), *Streptococcus* (18,91% x 17,88%), *Porphyromonas* (2,86% x 1,59%), *Selenomonas* (1,36% x 0,53%) e *Treponema* (0,96% x 0,33%) (GRÁFICO 6a). Indivíduos com percentil de sangramento ≥ 75 (n=9) de distribuição apresentaram maiores níveis de *Prevotella* (22,25% x 20%), *Streptococcus* (19,83% x 17,61%), *Porphyromonas* (3,63% x 1,42%, $p = 0,03$),

Treponema (1,02% x 0,28 %, $P = 0,009$), *Parvimonas* (0,28% x 0,07%, $p = 0,02$) e *Dialister* (0,27% x 0,10%, $p = 0,04$), enquanto aqueles com percentil < 75% ($n=52$), apresentaram maiores níveis de *Veillonella* (19,65% x 12,94%, $p = 0,02$), *Haemophilus* (12,83% x 8,48%, $p = 0,05$), *Actinomyces* (2,85% x 1,90%) e *Rothia* (2,36% x 1,55%). (GRÁFICO 6b). As diferenças estatísticas não atingiram nível de significância quando ajustados para o FDR.

GRÁFICO 5 PERFIL MICROBIANO EM RELAÇÃO AO CPO-D

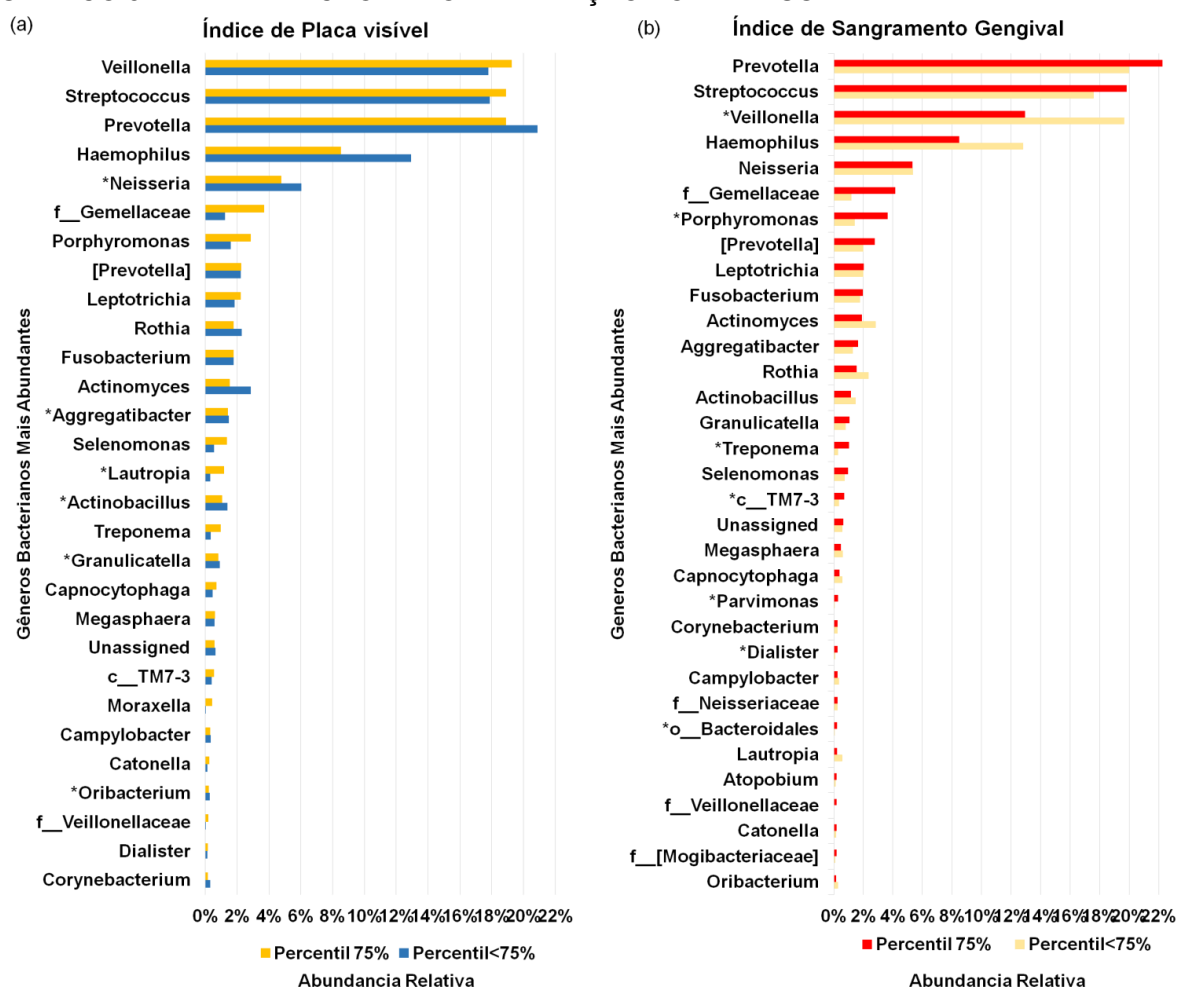


DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos com abundância relativa de acordo com o CPO-D. Cor azul CPO-D < 8; Cor Laranja: CPO-D ≥ 8.

NOTA: * $p < 0,05$

FONTE: O Autor (2016).

GRÁFICO 6 PERFIL MICROBIANO EM RELAÇÃO AO IPV E ISG



DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos com abundância relativa de acordo com o IPV (a) e ISG (b). Cor amarela: percentil $\geq 75\%$ e Cor azul percentil $< 75\%$.

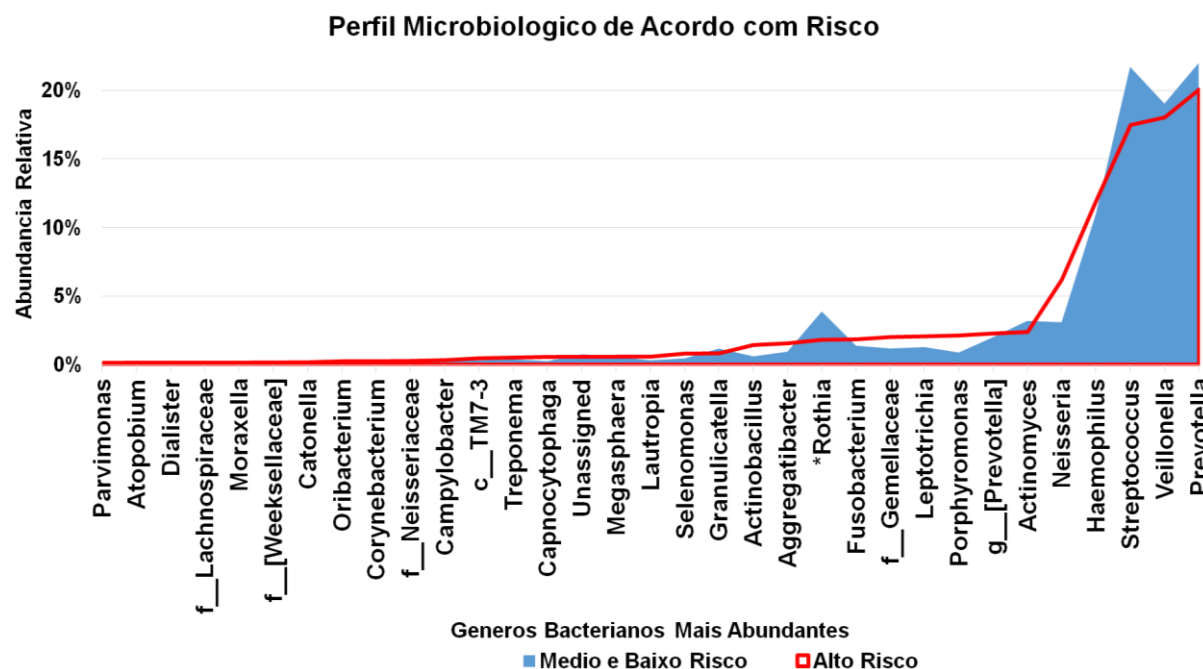
NOTA: IPV: Índice de placa visível; ISG: Índice de sangramento gengival * $p < 0.05$.

FONTE: O Autor (2016).

4.6 PERFIL MICROBIANO ASSOCIADO AOS FATORES DE RISCO PARA O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA ANEMIA DE FANCONI

A microbiota bucal foi analisada de acordo com esses parâmetros e também de acordo com o grupo de risco proposto pelos pesquisadores. Quando os indivíduos classificados no grupo de alto risco ($n = 51$) para o desenvolvimento de CCE bucal foram comparados com aqueles classificados no grupo de médio e baixo risco ($n = 10$), as observações foram de magnitude limitada, visto a disparidade de composição da amostra (GRÁFICO 7).

GRÁFICO 7 PERFIL MICROBIANO DE ACORDO COM O GRUPO DE RISCO



DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos mais abundantes de acordo com o grupo de risco. Cor azul: pacientes classificados com médio e baixo risco; Cor vermelha: pacientes classificados com alto risco para o desenvolvimento de CCE bucal

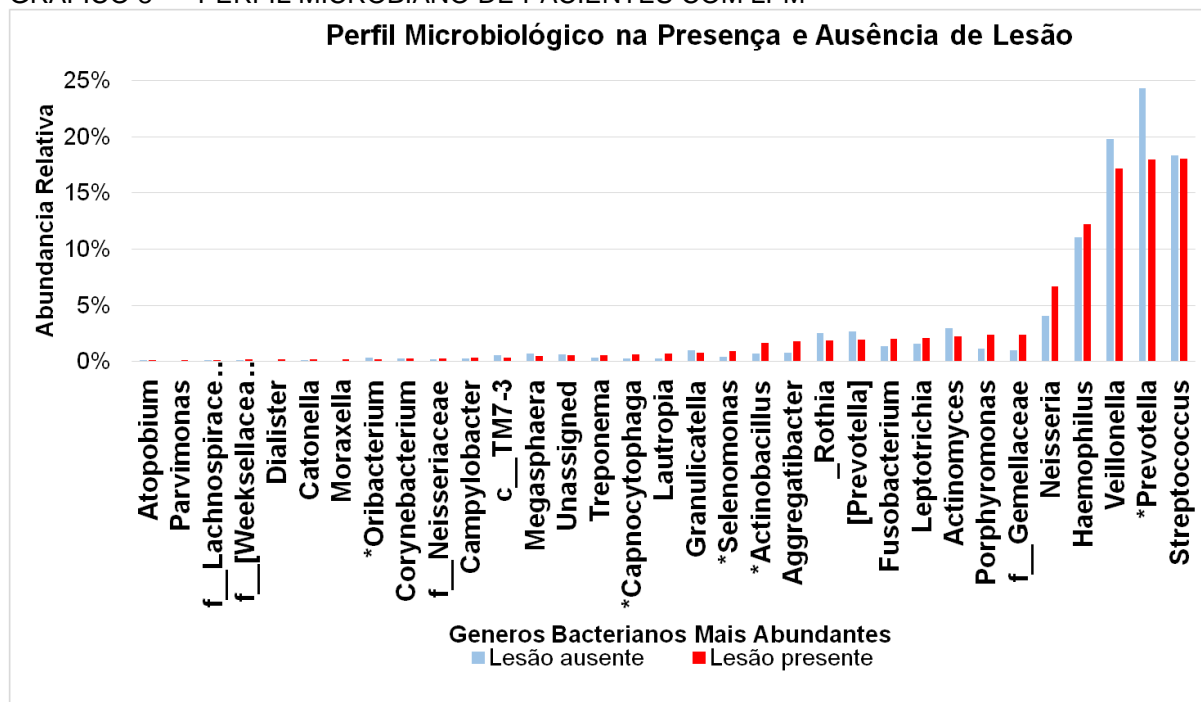
NOTA: CCE: carcinoma de células escamosas; * $p < 0.05$.

FONTE: O Autor (2016)

Pacientes com LPM apresentaram maiores proporções de *Haemophilus* (12,24% x 11,03%), *Neisseria* (6,67% x 4,07%), *Porphyromonas* (2,37% x 1,18%), *Actinobacillus* (1,65% x 0,71% $p = 0,04$), *Selenomonas* (0,96% x 0,40% $p = 0,047$), *Capnocytophaga* (0,66% x 0,28% $p = 0,009$) e *Treponema* (0,59% x 0,33%) (GRÁFICO 8).

Quando os fatores foram analisados individualmente, A história de DECH bucal ($n = 27$) esteve associada com o aumento na proporção de *Firmicutes* (43,8% x 38,5%, $p = 0,05$) e que os níveis de *Veillonella* (20,2% x 15,7%), *Streptococcus* (18,7% x 16%) e *Haemophilus* (13,0% x 10,7%) foram elevados neste grupo quando comparadas com indivíduos que não tinham histórico da doença ($n=26$). (GRÁFICO 9).

GRÁFICO 8 PERFIL MICROBIANO DE PACIENTES COM LPM



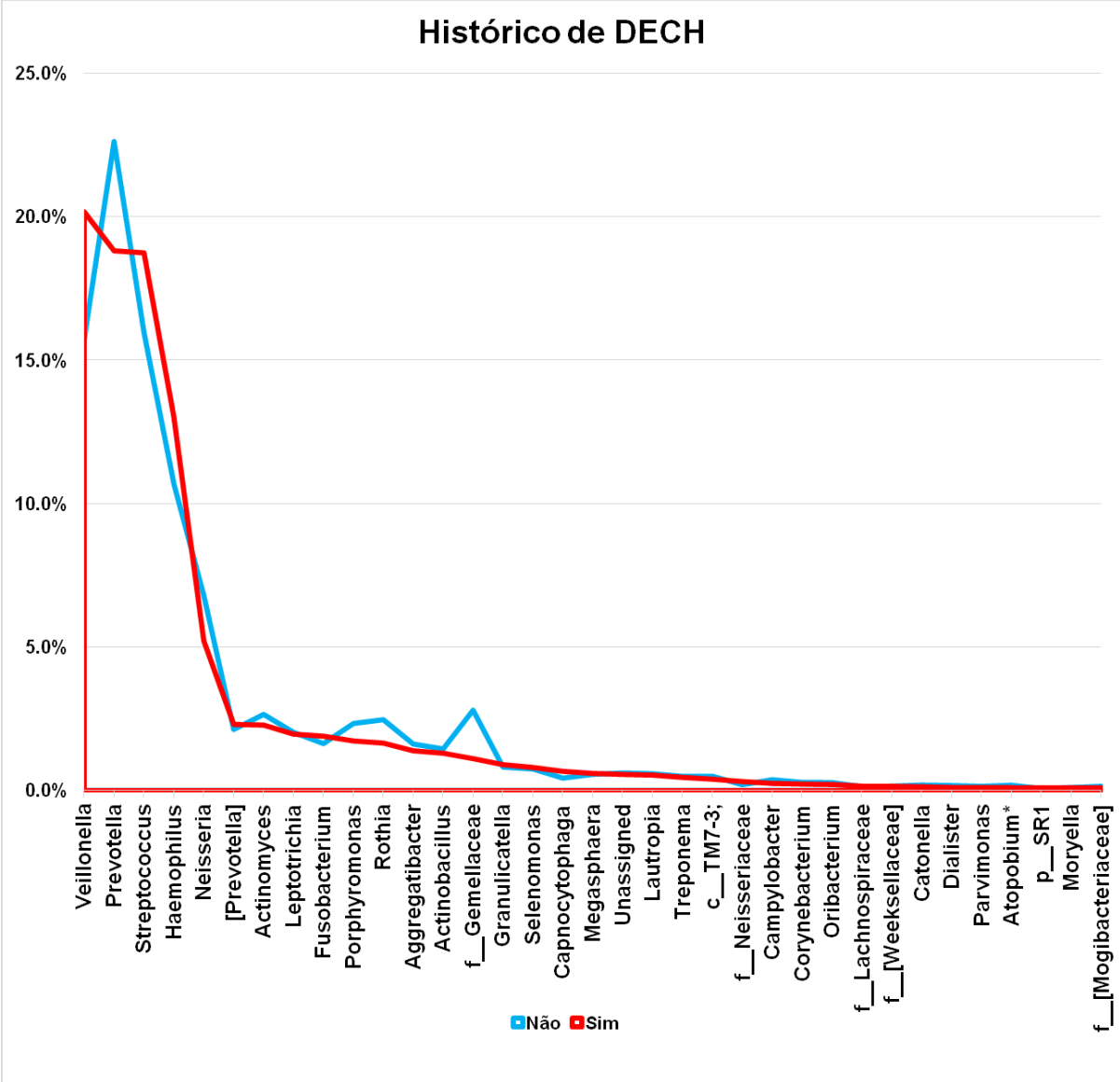
DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos mais abundantes em pacientes com LPM (n=38) comparando com pacientes sem LPM (n= 23). Cor azul: sem LPM ; Cor vermelha: pacientes com LPM

NOTA:LPM: Lesão potencialmente maligna; *p<0.05.

FONTE: O Autor (2016).

O histórico de mucosite foi estratificado em três níveis I, II e III, de acordo com o aumento da gravidade. Em histórico de casos mais graves, observaram-se níveis mais elevados de *Streptococcus* (19,25%), *Haemophilus* (12,8%), *Aggregatibacter* (3,6%, $p = 0,009$), bem como *Selenomonas* (1,9%, $p = 0,007$), *Capnocytophaga* (1,02%, $p = 0,02$) e *Corynebacterium* (0,5%, $p = 0,01$), em comparação com os grupos de menor gravidade (GRÁFICO 10).

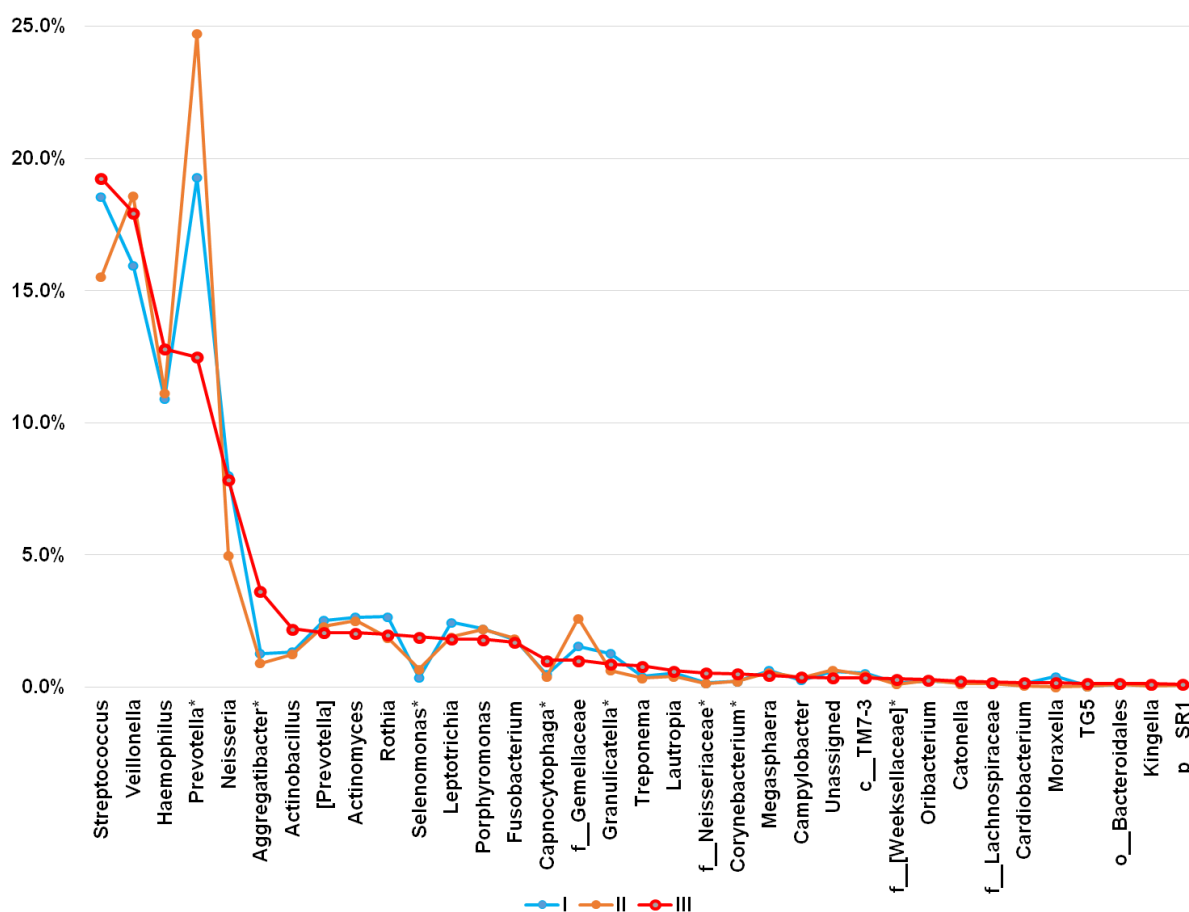
GRÁFICO 9 PERFIL MICROBIANO DE PACIENTES COM HISTÓRICO DE DECH BUCAL



DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos mais abundantes em pacientes (n=27) com histórico de DECH bucal. Cor azul: pacientes que não apresentaram DECH bucal; Cr vermelha: pacientes com histórico da doença.NOTA: DECH: Doença do enxerto contra o hospedeiro; *p<0.05.
FONTE: O Autor (2016).

GRÁFICO 10 PERFIL MICROBIANO DE ACORDO COM O HISTÓRICO DE MUCOSITE

Grau de Mucosite

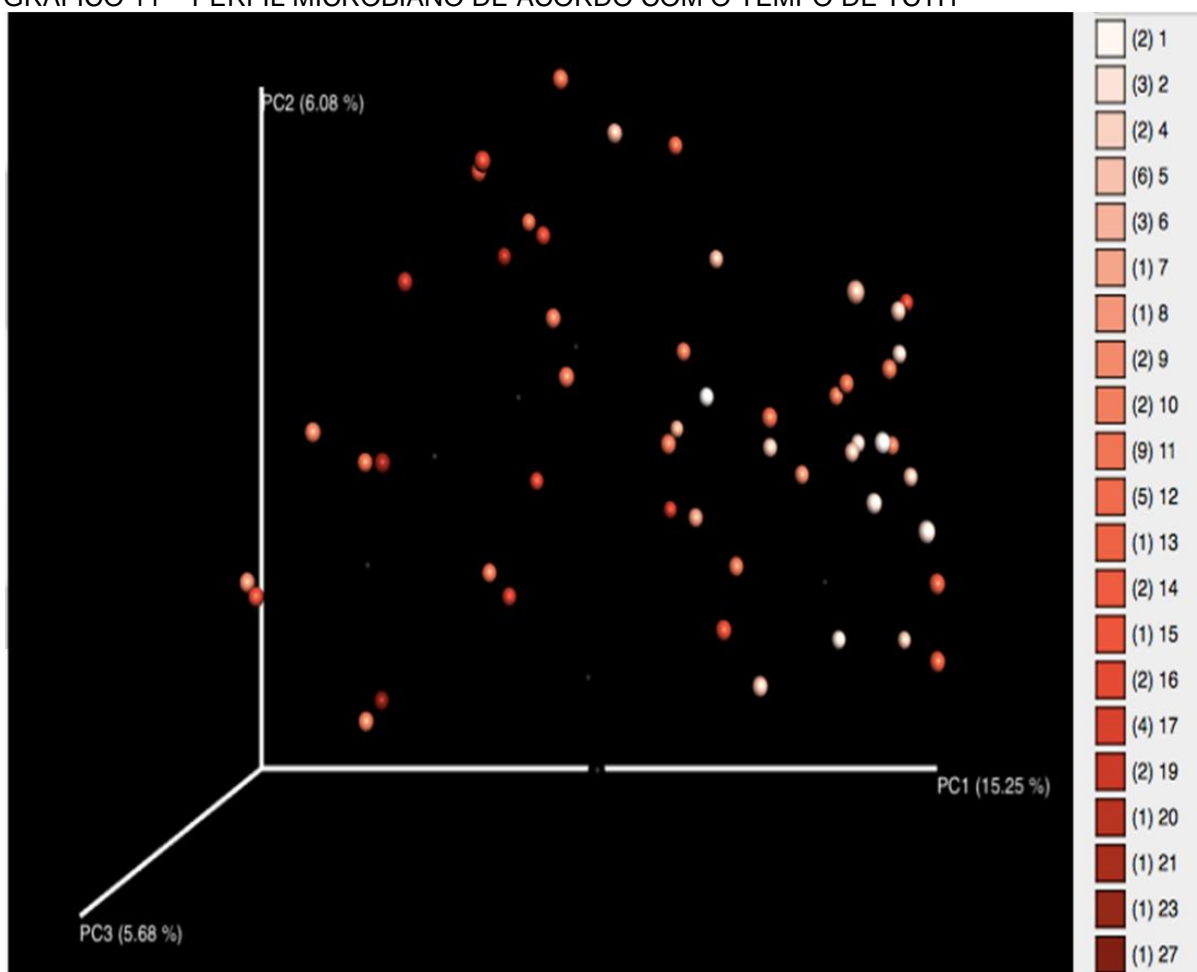


DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos mais abundantes em pacientes (n=53) com histórico de mucosite. Azul: Os pacientes com níveis de mucosite grau 0 e 1 (n = 15); Laranja: pacientes com nível de mucosite grau 2 (n = 26); Vermelhos: pacientes com nível de mucosite grau 3 e 4 (n = 8). Apenas um paciente tinha histórico de mucosite grau 0 e um paciente nível de mucosite 4.

FONTE: O Autor (2016).

O tempo desde o transplante foi estratificado em 4 níveis: 0-2 anos (n=5), 3-5 anos (n=8), 6-10 anos (n=9) e ≥ 11 anos (n=31). A análise utilizando de coordenadas principais com base nas distâncias unifrac não ponderados sugere uma tendência no agrupamento dos dados. Indivíduos que tiveram o transplante nos últimos anos parecem estar mais próximos do que aqueles que tiveram TCTH a mais tempo (GRÁFICO 11). Além disso, o grupo de pacientes submetidos ao TCTH ≥ 11 anos apresentaram níveis mais elevados de *Streptococcus* (18,4%), *Haemophilus* (12,7%) e *Neisseria* (6,8%) em comparação com os outros grupos. (GRÁFICO 12).

GRÁFICO 11 PERFIL MICROBIANO DE ACORDO COM O TEMPO DE TCTH

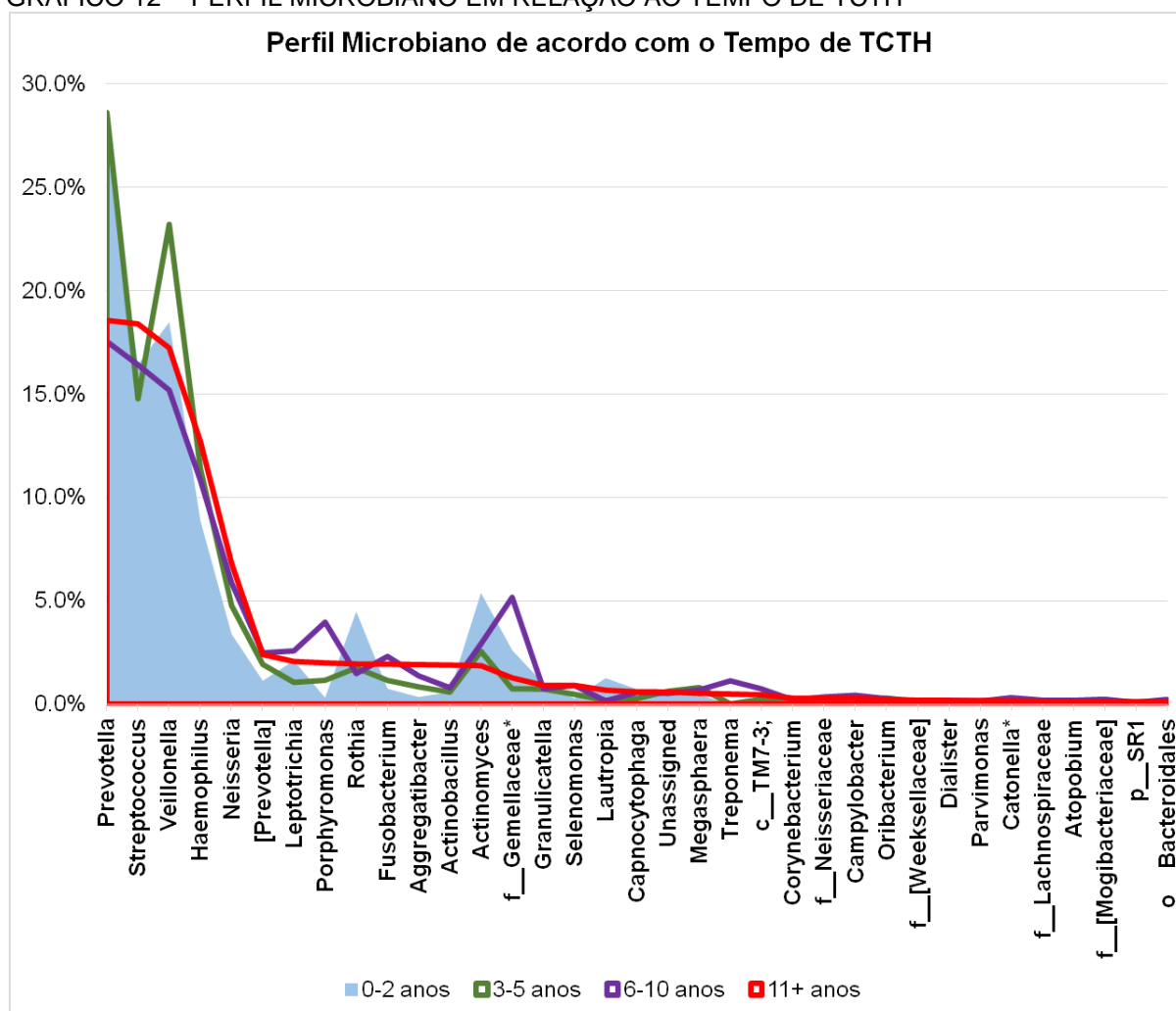


DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico de coordenadas principais (com base em distâncias unifrac não ponderadas) de acordo com o tempo de transplante em anos. Tons de laranja e vermelho mais intensos referem-se a mais tempo de TCTH. O número de indivíduos em cada categoria está indicado entre parênteses. Somente os indivíduos que receberam o transplante foram adicionados (n=53). Os resultados são referentes aos gêneros bacterianos mais abundantes.

NOTA: TCTH: Transplante de células tronco hematopéticas.

FONTE: O Autor (2016)

GRÁFICO 12 PERFIL MICROBIANO EM RELAÇÃO AO TEMPO DE TCTH



DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Gráfico representando os gêneros bacterianos mais abundantes em pacientes (n=53) transplantados.

NOTA: TCTH: Transplante de células tronco hematopéticas.

FONTE: O Autor (2016)

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi explorar o perfil da microbiota salivar de pacientes com AF comparando os resultados com os indicadores de saúde bucal e fatores de risco para o desenvolvimento do CCE na boca, tais como idade, tempo de TCTH, presença de lesões bucais, mucosite bucal e DECH. Para definir o perfil microbiano salivar foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA com o emprego do sequenciador de alto rendimento Miseq (Illumina).

No presente estudo, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram os filos bacterianos com maior abundância relativa e *Prevotella*, *Veillonella*, e *Streptococcus* foram os

gêneros mais frequentemente detectados. Estes resultados estão de acordo com estudos que analisaram a microbiota salivar de pacientes em bom estado de saúde geral e com doenças sistêmicas tais como o HIV. (LAZAREVIC et al., 2010; GOLDBERG et al., 2015; GUERRERO-PRESTON et al., 2016).

Quando os parâmetros bucais foram avaliados, observou-se que os indivíduos que relataram ter excelente / muito boa e/ou boa saúde bucal apresentaram maior abundância relativa de *Neisseria* e *Rothia*. Bactérias pertencentes a esses gêneros bacterianos são consideradas compatíveis com saúde bucal. Aqueles que relataram ter sangramento gengival apresentaram gêneros de bactérias pertencentes aos complexos de bactérias periodontopatogênicas. (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Apesar do uso de questionários apresentar limitações, esse instrumento pode ser utilizado como um indicador de saúde bucal importante nos casos mais graves de doença periodontal. (EKE et al., 2013), especialmente quando o paciente não está apto para receber um exame bucal profissional ou quando ele mora longe do centro de referência e não tem acesso a um cirurgião dentista.

No nosso estudo, a porcentagem média de sítios com placa (31,3%) e sangramento gengival (34,2%) obtiveram valores maiores que os recomendados para saúde bucal e a mediana de CPO-D foi de 5. Um estudo realizado com 48 pacientes com AF encontrou uma mediana de CPO-D similar ao nosso estudo e quando os valores foram comparados com um grupo controle de pacientes sem a doença, concluíram que os padrões de saúde bucal não diferiram entre os grupos. (LYKO et al., 2013). Observou-se também que pacientes com o CPO-D ≥ 8 tinham uma tendência em apresentar um aumento na abundância relativa de *Streptococcus* ssp. e *Neisseria*. Yalman et al. (2011) avaliou 16 adolescentes com AF e não encontrou diferença na concentração de *Lactobacilos* e *Streptococcus mutans* quando pacientes transplantados e não transplantados foram comparados. Apesar do comportamento cariogênico de pacientes com AF parecer seguir o mesmo padrão que a população em geral, vale ressaltar que bactérias desses gêneros são as principais responsáveis pela produção de alguns metabólitos com potencial carcinogênico, alertando assim a necessidade de limitação da cárie nesse grupo de pacientes.

Para os parâmetros bucais examinados, nós focamos principalmente no ISG, porque a sua associação com a resposta inflamatória local é uma métrica mais

objetiva que o IPV. Quando o perfil microbiano de indivíduos com maior ISG foi analisado, observou-se maior abundância relativa de *Porphyromonas*, *Treponema*, *Prevotella*, *Parvimonas* e *Dialister* SP. Esses gêneros incluem membros de microrganismos do complexo vermelho (*Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*) e laranja (*Prevotella intermedia* e *Parvimonas micra*) (SOCRANSKY et al., 2004), bem como agentes patogênicos periodontais recentemente propostos (*Dialister pneumosintes* e *Dialister invisus*) (PÉREZ-CHAPARRO et al., 2014), todos estes microrganismos estão associados com a inflamação dos tecidos periodontais. (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Um estudo investigou a presença de 4 bactérias periodontais (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola*) na saliva de 71 pacientes com AF. Utilizando o método de PCR os autores não encontraram diferença na identificação desses microrganismos quando grupos caso e controle foram comparados, concluindo que as manifestações sistêmicas de pacientes com AF não afetaram a distribuição destas bactérias quando comparados ao grupo controle. (LYKO et al., 2013).

Com base na literatura e na experiência clínica do grupo, foram propostas 3 categorias de risco para o câncer bucal (alto, médio e baixo risco). No entanto, as comparações foram de magnitude limitada considerando as disparidades de composição da amostra. Assim, fatores de risco tais como TCTH, histórico de DECH, mucosite bucal e presença de LPM foram avaliadas individualmente. Observou-se que aqueles pacientes com histórico de DECH, maior gravidade de mucosite bucal e transplantado há mais de 11 anos apresentaram coletivamente níveis mais elevados de *Veillonella* e *Streptococcus*. A *Veillonella parvula*, por sua vez, foi descrita como uma espécie colonizadora de tecidos neoplásicos. (PUSTELNY et al., 2015). Os parâmetros de saúde bucal poderiam ser sugeridos como um algoritmo na classificação de risco para o desenvolvimento de CCE. Classificar o paciente em grupos de risco permite o desenvolvimento de estratégias de prevenção, podendo incluir o mesmo em uma rotina de consultas com o especialista em saúde bucal de maneira diferenciada e com menor tempo.

Pacientes com LPM apresentaram maior abundância relativa de *Haemophilus*, *Neisseria*, *Porphyromonas* e *Capnocytophaga*. Em um estudo, pacientes com leucoplasia apresentaram maiores proporções salivares de *Haemophilus* quando comparados com o grupo controle. (HU et al., 2016). *Neisseria*

e *Porphyromonas* estavam mais elevados na saliva de pacientes com líquen plano bucal erosivo e *Capnocytophaga* mais abundante na saliva de pacientes com líquen plano reticular. (WANG et al., 2016). Ambos os estudos concluíram que alterações de microbiota bucal podem estar associadas com a presença de lesões. Porém, mais uma vez não é possível estabelecer a relação causal entre o aparecimento de lesões, alterações de microbiota e o desenvolvimento do câncer. Não sabe se a microbiota sofreu alterações pela presença de lesões ou se a mesma promoveu o aparecimento das lesões.

Contudo, nossos resultados são inquietantes, visto que recentemente a microbiota bucal foi associada ao câncer. Os gêneros mais abundantes na saliva de pacientes com CCE foi descrita como sendo composta de *Streptococcus*, *Prevotella*, *Haemophilus* e *Veillonella*. (GUERRERO-PRESTON et al., 2016). Além disso, algumas espécies de *Streptococcus*; *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus intermedius* e *Streptococcus mitis* (KURKIVUORI et al., 2007) e *Neisseria* sp. (MUTO et al., 2000) foram apontadas como sintetizadoras de acetaldeído; um carcinógeno bem estabelecido e a microbiota bucal como a maior produtora desse composto. (HOMANN et al., 1997; HOMANN, 2001). Esses resultados foram evidenciados após o decréscimo do nível de aldeído salivar com o uso de bochechos bucais. (HOMANN et al., 1997). Além disso, o *Streptococcus mitis* foi encontrado em elevado nível salivar em pacientes com CCE quando comparados com um grupo controle. (MAGER et al., 2005).

Embora um estudo tenha demonstrado que os indivíduos saudáveis e pacientes com CCE abrigavam uma abundância relativa semelhante do gênero *Streptococcus* e *Neisseria* (HU et al., 2016), nossa hipótese é que, para a AF, altas concentrações desses microrganismos produtores de aldeídos podem ser desafiadoras, visto a dificuldade de reparo do DNA que eles apresentam. (JOENJE, 2011; LANGEVIN et al., 2011; ROSADO et al., 2011; GARAYCOECHEA et al., 2012). Outro ponto importante é a ação sinérgica demonstrada entre o aumento na produção de aldeído devido alterações de microbiota, uso do tabaco, álcool e o câncer de esôfago. (PENG et al., 2016). O aldeído em concentrações mais elevadas parece interagir diretamente com a peroxidação lipídica da célula e induzir um dano direto ao DNA. (GARCIA et al., 2011). Apesar de um número reduzido, onze pacientes do grupo de alto risco declararam fumar ou ter tido algum contato com o tabaco e treze deles consumiam bebidas alcoólicas. Esses fatores podem ter sido

importantes modificadores da microbiota bucal desses indivíduos. Dentre as limitações desse estudo, destaca-se o tamanho da amostra, o que dificultou a distribuição homogênea dos grupos. No entanto, ela é representativa visto que a incidência estimada para a doença é de 1: 250.000 nascimentos. (DONG et al., 2015). O desenho do estudo foi observacional transversal e não foi possível estabelecer um grupo controle. Apesar de não ser possível estabelecer causalidade, nossos resultados apontam diferenças no perfil microbiano e sugerem que os pacientes com AF devem ser monitorados quanto a presença de lesões e o cuidado com a saúde bucal, visto que a interação entre os microrganismos e o processo de transformações malignas não pode ser descartada. A técnica empregada não foi totalmente quantitativa e para esse trabalho os resultados foram expressos em nível de filo e gênero. Sugerem-se avaliações adicionais para estabelecer a taxonomia em nível de espécie. Além disso, a maior parte dos microrganismos presentes na saliva representa a microbiota residente no dorso lingual. Sabe-se que as bactérias bucais são sítios dependentes e que os tecidos bucais podem servir de habitat para diferentes nichos microbianos. (MAGER et al., 2003). Novos esforços devem ser direcionados na determinação da população microbiana presente em cada sítio bucal em especial na superfície de LPM. A quantificação dos metabólitos produzidos pelas bactérias em especial os aldeídos, pode ser um próximo passo importante no entendimento do mecanismo de ação desse composto nos tecidos bucais, visto a escassez de informação na literatura, principalmente na AF.

Apesar dessas considerações, esses resultados apresentam o primeiro passo no entendimento da microbiota da boca de pacientes com AF. Os resultados apontam que pacientes com AF apresentam uma microbiota semelhante ao encontrado para a população em geral. Porém, especula-se que o potencial inflamatório e os metabólitos produzidos por esses microrganismos possam não ser bem tolerados por pacientes com AF, levando em conta as características genéticas da síndrome.

6 CONCLUSÕES

Concluimos que pacientes com AF que apresentaram uma pior condição de saúde bucal de acordo com os parâmetros utilizados também apresentaram maior abundância relativa de gêneros bacterianos compatíveis com doença periodontal.

Apesar da comparação limitada entre os grupos de risco; pacientes transplantados há mais tempo com histórico de mucosite e DECH apresentaram um perfil microbiano diferente, com um aumento na abundância relativa do gênero *Streptococcus*. Indivíduos com LPM apresentaram maior abundância relativa de *Neisseria*, e bactérias pertencentes a esse grupo também são importantes sintetizadores de aldeído.

Os resultados da autopercepção de saúde bucal foram compatíveis com os grupos microbianos esperados em condições de saúde e doença. Apesar de apresentar limitações, esse instrumento pode ser sugerido como ferramenta de diagnóstico de saúde bucal quando o paciente não está apto para o exame bucal ou não tem acesso a um cirurgião dentista.

REFERÊNCIAS

- AÇIKGÖZ, A; et al. Oral and Dental Findings in Fanconi'S Anemia. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 22, n. 6, p. 531–539, 2005.
- ALTER, B. P. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. **Cancer**, v. 97, n. 2, p. 425–440, 2003.
- ALTER, B. P. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. **Pediatric transplantation**, v. 9 Suppl 7, p. 81–6, 2005.
- ALTER, B. P. Fanconi anemia and the development of leukemia. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, v. 27, n. 3–4, p. 214–221, 2014.
- ALTER, B. P.; et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. **British Journal of Haematology**, v. 150, n. 2, p. 179–188, 2010.
- ALTER, B. P.; et al. Squamous cell carcinomas in patients with Fanconi anemia and dyskeratosis congenita: a search for human papillomavirus. **Int J Cancer**, v. 133, n. 6, p. 1513–1515, 2013.
- ALTER, B. P.; KUPFER, G. Fanconi Anemia. **Gene reviews**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016.
- ALTER, B. P.; ROSENBERG, P. S. VACTERL-H Association and Fanconi Anemia. **Molecular Syndromology**, v. 4, n. 1–2, p. 87–93, 2013.
- AMES, N. J.; et al. A characterization of the oral microbiome in allogeneic stem cell transplant patients. **PLoS One**. v. 7, p.e47628, 2012.
- ARAUJO, M. R. DE; et al. Fanconi's anemia: Clinical and radiographic oral manifestations. **Oral Diseases**, v. 13, n. 3, p. 291–295, 2007.
- ARAUJO, M. R. DE; et al. High prevalence of oral human papillomavirus infection in Fanconi's anemia patients. **Oral Diseases**, v. 17, n. 6, p. 572–576, 2011.
- AUERBACH, A. D. Fanconi anemia and its diagnosis. **Mutation research**, v. 668, n. 1–2, p. 4–10, 2009.
- AUERBACH, A. D. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. **Current Protocols in Human Genetics**. v. 85, p. 8.7.1-17, 2015.
- AVILA, L. F. D.; et al. A Study of Facial Pattern in Patients With Fanconi Anemia. **Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v. 51, n. 1, p. 83–89, 2014.
- BEBEK, G.; et al. Microbiomic subprofiles and MDR1 promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 7, p. 1557–1565, 2012.
- BIRKELAND, A. C.; et al. Postoperative clinical radiosensitivity in patients with fanconi anemia and head and neck squamous cell carcinoma. **Archives of otolaryngology--head & neck surgery**, v. 137, n. 9, p. 930–4, 2011.

BONFIM, C. M.; et al. HLA-Matched Related Donor Hematopoietic Cell Transplantation in 43 Patients with Fanconi Anemia Conditioned with 60 mg/kg of Cyclophosphamide. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 13, n. 12, p. 1455–1460, 2007.

BONFIM, C.; et al. Long-term Survival, Organ Function, and Malignancy after Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Fanconi Anemia. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 22, n. 7, p. 1257–1263, 2016.

BREMER, M.; et al. Fanconi's Anemia and Clinical Radiosensitivity. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 179, n. 11, p. 748–753, 2003.

CAPORASO, J. G.; et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CAPORASO, J. G.; et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108 Suppl, p. 4516–4522, 2011.

CARTER, H. G.; BARNES, G. P. The Gingival Bleeding Index. **Journal of Periodontology**, v. 45, n. 11, p. 801–5, 1974.

CASTELLA, M.; et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. **Journal of Medical Genetics**, v. 48, n. 4, p. 242–50, 2011.

CAVALCANTI, L. G.; et al. Oral Manifestations Compatible with Chronic Graft-versus-Host Disease in Patients with Fanconi Anemia. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 21, n. 2, p. 275–280, 2015.

CAVALCANTI, L. G.; et al. Oral leukoplakia in patients with Fanconi anaemia without hematopoietic stem cell transplantation. **Pediatric blood & cancer**, v. 62, n. 6, p. 1024–6, 2015.

CHEN, H.; JIANG, W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1–6, 2014.

CHEN, T.; et al. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2010, p. baq013, 2010.

CORREA, P.; HOUGHTON, J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 659–672, 2007.

CURTIS, R. E.; et al. Impact of chronic GVHD therapy on the development of squamous-cell cancers after hematopoietic stem-cell transplantation: an international case-control study. **Blood**, v. 105, n. 10, p. 3802–11, 2005.

D'ANDREA, A. D. The Fanconi road to cancer. **Genes and Development**, v. 17, n. 617, p. 1933–1936, 2003.

DEEG, H. J.; et al. Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. **Blood**, v. 87, n. 1, p. 386–392, 1996.

DEWHIRST, F. E.; et al. The human oral microbiome. **J Bacteriol**, v. 192, n. 19, p. 5002–5017, 2010.

DIAMOND, L. K.; SHAHIDI, N. T. Treatment of aplastic anemia in children. **Seminars in Hematology**, v. 4, n. 3, p. 278–88, 1967.

DOKAL, I. The genetics of Fanconi's anaemia. **Baillière's Best Practice & Research. Clinical Haematology**, v. 13, n. 3, p. 407–25, 2000.

DONG, H.; et al. Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. **Human genomics**, v. 9, n. 1, p. 32, 2015.

EKE, P. I.; et al. Self-reported measures for surveillance of periodontitis. **Journal Dental Research**, v. 92, n. 11, p. 1041–1047, 2013.

ELLMERICH, S.; et al. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 4, p. 753–756, 2000.

EPSTEIN, J. B.; et al. Advances in hematologic stem cell transplant: an update for oral health care providers. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 107, n. 3, p. 301–12, 2009.

FANCONI, G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (F.A.). I. Clinical aspects. **Seminars in hematology**, v. 4, n. 3, p. 233–40, 1967.

FELLER, L.; ALTINI, M.; LEMMER, J. Inflammation in the context of oral cancer. **Oral Oncol**, v. 49, n. 9, p. 887–892, 2013.

FREY, K. G.; et al. Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. **BMC genomics**, v. 15, p. 96, 2014.

FURQUIM, C. P.; et al. Mouth self-examination as a screening tool for oral cancer in a high-risk group of patients with Fanconi anemia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 118, n. 4, p. 440–446, 2014.

GARAYCOECHEA, J. I.; et al. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. **Nature**, v. 489, n. 7417, p. 571–575, 2012.

GARCIA, C. C. M.; et al. [13C2]-Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine in human cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 24, p. 9140–3, 2011.

GIAMPIETRO, P. F.; et al. Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an international Fanconi Anemia Registry Study. **American Journal of Medical Genetics**, v. 68, n. 1, p. 58–61, 1997.

GIRI, N.; et al. Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 7, p. 2624–31, 2007.

GLUCKMAN, E. Radiosensitivity in Fanconi anemia: application to the conditioning for bone marrow transplantation. **Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**, v. 18 Suppl 1, p. 88–93, 1990.

GLUCKMAN, E.; WAGNER, J. E. Hematopoietic stem cell transplantation in childhood inherited bone marrow failure syndrome. **Bone marrow transplantation**, v. 41, n. 2, p. 127–32, 2008.

GOLDBERG, B. E.; et al. The oral bacterial communities of children with well-controlled HIV infection and without HIV infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–19, 2015.

GUERRERO-PRESTON, R.; et al. 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, Human Papilloma Virus infection and surgical treatment. **Oncotarget**, 2016.

HEIMDAHL, A.; et al. The oral cavity as a port of entry for early infections in patients treated with bone marrow transplantation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 68, n. 6, p. 711–716, 1989.

HENRICH, B.; et al. Mycoplasma salivarium as a dominant coloniser of Fanconi anaemia associated oral carcinoma. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92297, 2014.

HOMANN, N. Alcohol and upper gastrointestinal tract cancer: the role of local acetaldehyde production. **Addict Biol**, v. 6, n. 4, p. 309–323, 2001.

HOMANN, N.; et al. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 9, p. 1739–1743, 1997.

HOMANN, N.; et al. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 22, p. 1692–7, 1997.

HU, X.; et al. Changes in the salivary microbiota of oral leukoplakia and oral cancer. **Oral oncology**, v. 56, p. e6-8, 2016.

JALALI, A.; et al. The Effect of GVHD on Long-term Outcomes after Peripheral Blood Allogeneic Stem Cell Transplantation from an HLA-identical Sibling in Adult Acute Lymphocytic Leukemia: A Landmark Analysis Approach in Competing Risks. **Int J Hematol Oncol Stem Cell Res**, v. 8, n. 2, p. 1–8, 2014.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–4, 2007.

JAVED, F.; WARNAKULASURIYA, S. Is there a relationship between periodontal disease and oral cancer? A systematic review of currently available evidence.

Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 97, p. 197–205, 2015.

JOENJE, H. Alcohol , DNA. **Nature**, p. 7–8, 2011.

JONES, L. R.; TOTH, B. B.; KEENE, H. J. Effects of total body irradiation on salivary gland function and caries-associated oral microflora in bone marrow transplant patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 73, n. 6, p. 670–676, 1992.

KEE, Y.; D'ANDREA, A. D. Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 11, p. 3799–806, 2012.

KERVILER, E. DE; et al. The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia. **Clinical radiology**, v. 55, n. 5, p. 340–5, 2000.

KHAN, N. E.; ROSENBERG, P. S.; ALTER, B. P. Preemptive Bone Marrow Transplantation and Event-Free Survival in Fanconi Anemia. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 3624, 2015.

KIRCHER, M.; KELSO, J. High-throughput DNA sequencing - Concepts and limitations. **BioEssays**, v. 32, n. 6, p. 524–536, 2010.

KOUBIK, A. C. G. DE A.; et al. Comparative study of chronological, bone, and dental age in Fanconi's anemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 28, n. 4, p. 260–262, 2006.

KURKIVUORI, J.; et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. **Oral Oncol**, v. 43, n. 2, p. 181–186, 2007.

KUTEN-SHORRER, M.; WOO, S.-B.; TREISTER, N. S. Oral graft-versus-host disease. **Dental clinics of North America**, v. 58, n. 2, p. 351–68, 2014.

KUTLER, D. I.; et al. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. **Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery**, v. 129, n. 1, p. 106–12, 2003.

KUTLER, D. I.; et al. Natural history and management of Fanconi anemia patients with head and neck cancer: A 10 year follow-up. **The Laryngoscope**, n. 4, p. 1–10, 2015.

KUTLER, D. I.; et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1249–56, 2003.

KUTLER, D. I.; et al. Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 22, p. 1718–21, 2003.

LANGEVIN, F.; et al. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 53–58, 2011.

LAZAREVIC, V.; et al. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. **BMC genomics**, v. 11, p. 523, 2010.

LAZAREVIC, V.; et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 3, p. 266–271, 2009.

LIU, L.; et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 251364, 2012.

LOWY, D. R. A New Link Between Fanconi Anemia and Human Papillomavirus-Associated Malignancies. **Cancer Spectrum Knowledge Environment**, v. 95, n. 22, p. 1648–1650, 2003.

LYKO, K.; et al. Salivary detection of periodontopathic bacteria in Fanconi's anemia patients. **Anaerobe**, v. 24, p. 32–35, 2013.

LYKO, K.; et al. Oral health status in children and adolescents with Fanconi anemia. **Special Care in Dentistry**, v. 36, n. 2, p. 71–4, 2016.

MACMILLAN, M. L.; et al. Cellular therapy for fanconi anemia: the past, present, and future. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 17, n. 1 Suppl, p. S109–14, 2011.

MAGDALENA, N.; et al. Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the FANCA 3788-3790del mutation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 5, p. 669–73, 2005.

MAGER, D. L.; et al. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. **J Transl Med**, v. 3, p. 27, 2005.

MAGER, D. L.; et al. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 7, p. 644–654, 2003.

MAJHAIL, N. S.; et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 34, n. 2, p. 109–133, 2012.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, n. 1, p. 387–402, 2008.

MASSEROT, C.; et al. Head and neck squamous cell carcinoma in 13 patients with Fanconi anemia after hematopoietic stem cell transplantation. **Cancer**, v. 113, n. 12, p. 3315–22, 2008.

MAYS, J. W.; et al. Oral chronic graft-versus-host disease: current pathogenesis, therapy, and research. **Oral Diseases**, v. 19, n. 4, p. 327–346, 2013.

MEDEIROS, C.; ZANIS-NETO, J.; PASQUINI, R. Bone marrow transplantation for patients with Fanconi anemia: reduced doses of cyclophosphamide without irradiation as conditioning. **Bone marrow transplantation**, v. 24, n. 8, p. 849–52, 1999.

MEETEI, A. R.; et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group

B. **Nature Genetics**, v. 36, n. 11, p. 1219–24, 2004.

MEISEL, P.; HOLTFRETER, B.; BIFFAR, R.; SUEMNIG, W.; KOCHER, T. Association of periodontitis with the risk of oral leukoplakia. **Oral Oncology**, v. 48, n. 9, p. 859–63, 2012.

MEURMAN, J. H. Oral microbiota and cancer. **J Oral Microbiol**, v. 2, 2010.

MEURMAN, J. H.; UITTAMO, J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. **Acta Odontol Scand**, v. 66, n. 6, p. 321–326, 2008.

MICHAUD, D. S.; IZARD, J. Microbiota, oral microbiome, and pancreatic cancer. **Cancer J**, v. 20, n. 3, p. 203–206, 2014.

MILLEN, F. J.; et al. Oral squamous cell carcinoma after allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anaemia. **British journal of haematology**, v. 99, n. 2, p. 410–4, 1997.

MIMA, K.; et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. **Gut**, 2015.

MIYAMOTO, M.; et al. Performance comparison of second- and third-generation sequencers using a bacterial genome with two chromosomes. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 699, 2014.

MOLINA-ESTEVEZ, F. J.; et al. Lentiviral-mediated Gene Therapy in Fanconi Anemia-A Mice Reveals Long-Term Engraftment and Continuous Turnover of Corrected HSCs. **Current gene therapy**, v. 15, n. 6, p. 550–562, 2015.

MONSJOU, H. S. VAN; et al. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Oral Oncology**, v. 49, n. 12, p. 1097–102, 2013.

MÜLLER, L. U. W.; et al. Induced pluripotent stem cells as a tool for gaining new insights into Fanconi anemia. **Cell Cycle**, v. 11, n. 16, p. 2985–90, 2012.

MUTO, M.; et al. Acetaldehyde production by non-pathogenic *Neisseria* in human oral microflora: implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract. **Int J Cancer**, v. 88, n. 3, p. 342–350, 2000.

NEVELING, K.; et al. Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. **Mutation Research**, v. 668, n. 1–2, p. 73–91, 2009.

NOWZARI, H.; et al. Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 11, p. 1601–6, 2001.

PARK, J. W.; et al. High incidence of HPV-associated head and neck cancers in FA deficient mice is associated with E7's induction of DNA damage through its inactivation of pocket proteins. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75056, 2013.

PASQUINI, R.; et al. HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation for fanconi anemia: comparison of irradiation and nonirradiation containing conditioning regimens. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 14, n. 10, p. 1141–7,

2008.

PASTER, B. J.; et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3770–83, 2001.

PAVLETIC, S. Z.; et al. Chronic graft-versus-host disease: implications of the National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials. **Bone Marrow Transplantation**, v. 38, n. 10, p. 645–51, 2006.

PENG, Q.; CHEN, H.; HUO, J. Alcohol consumption and corresponding factors: A novel perspective on the risk factors of esophageal cancer (Review). **Oncology Letters**, p. 3231–3239, 2016.

PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 9, p. 846–58, 2014.

POZHITKOV, A. E.; et al. High-throughput methods for analysis of the human oral microbiome. **Periodontology** 2000, v. 55, n. 1, p. 70–86, 2011.

PUSHALKAR, S.; et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 144, 2012.

PUSTELNY, C.; et al. Contribution of Veillonella parvula to Pseudomonas aeruginosa-mediated pathogenicity in a murine tumor model system. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 1, p. 417–29, 2015.

RAJEEV, R.; et al. Role of bacteria in oral carcinogenesis. **South Asian J Cancer**, v. 1, n. 2, p. 78–83, 2012.

REUTER, S.; et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–16, 2010.

ROKKAS, T.; et al. Helicobacter pylori infection and gastric histology in first-degree relatives of gastric cancer patients: a meta-analysis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 9, p. 1128–1133, 2010.

ROMICK-ROSENDALE, L. E.; et al. The Fanconi anemia pathway: repairing the link between DNA damage and squamous cell carcinoma. **Mutation research**, v. 743–744, p. 78–88, 2013.

ROSADO, I. V.; et al. Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. **Nat Struct Mol Biol**, v. 18, n. 12, p. 1432–1434, 2011.

ROSE, S. R.; et al. Oxandrolone for the treatment of bone marrow failure in Fanconi anemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 1, p. 11–9, 2014.

ROSE, S. R.; et al. Endocrine phenotype of children and adults with Fanconi anemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 59, n. 4, p. 690–6, 2012.

ROSENBERG, P. S. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. **Blood**, v. 105, n. 1, p. 67–73, 2005.

ROSENBERG, P. S.; ALTER, B. P.; EBELL, W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 511–517, 2008.

ROSENBERG, P. S.; GREENE, M. H.; ALTER, B. P. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. **Blood**, v. 101, n. 3, p. 822–6, 2003.

ROSENBERG, P. S.; et al. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. **Blood**, v. 105, n. 1, p. 67–73, 2005.

ROSENBERG, P. S.; TAMARY, H.; ALTER, B. P. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 155, n. 8, p. 1877–1883, 2011.

ILURDOZ, M.S; et al. Anemia de Fanconi. Consideraciones actuales. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 26, n. 1, p. 63–78, 2003.

SANTOS, F.; SELESNICK, S. H.; GLASGOLD, R. A. Otologic manifestations of Fanconi anemia. **Otology & Neurotology**, v. 23, n. 6, p. 873–5, 2002.

SARAIVA, L.; et al. Evaluation of subgingival bacterial plaque changes and effects on periodontal tissues in patients with renal transplants under immunosuppressive therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 4, p. 457–462, 2006.

SAUTER, S. L.; et al. Oral human papillomavirus is common in individuals with Fanconi anemia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 24, n. 5, p. 864–72, 2015.

SCHECKENBACH, K.; et al. Treatment of the bone marrow failure in Fanconi anemia patients with danazol. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 48, n. 2, p. 128–31, 2012.

SCHECKENBACH, K.; et al. Squamous cell carcinomas of the head and neck in Fanconi anemia: risk, prevention, therapy, and the need for guidelines. **Klinische Pädiatrie**, v. 224, n. 3, p. 132–8, 2012.

SCHMIDT, B. L.; et al. Changes in Abundance of Oral Microbiota Associated with Oral Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e98741, 2014.

SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 11, p. 800–812, 2013.

SHIMAMURA, A. Inherited bone marrow failure syndromes: molecular features. **Hematology**, p. 63–71, 2006.

SOCIÉ, G.; et al. Transplantation for Fanconi's anaemia: long-term follow-up of fifty patients transplanted from a sibling donor after low-dose cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning. **British journal of haematology**, v. 103, n. 1, p. 249–55, 1998.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology** 2000, v. 38, p. 135–187, 2005.

SOCRANSKY, S. S.; et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 6, p. 352–62, 2004.

SOCRANSKY, S. S.; et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134–144, 1998.

SOULIER, J.; et al. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA / BRCA pathway. **Blood**, v. 105, n. 3, p. 1329–1337, 2015.

TANAKA, H. Advances in cancer epidemiology in Japan. **Int J Cancer**, v. 134, n. 4, p. 747–754, 2014.

TANIGUCHI, T.; D'ANDREA, A. D. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4223–33, 2006.

TEKCICEK, M.; et al. Oral and dental findings in children with Fanconi anemia. **Pediatric dentistry**, v. 29, n. 3, p. 248–52, 2007.

TELES, R. P.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbiological goals of periodontal therapy. **Periodontology** 2000, v. 42, n. 1, p. 180–218, 2006.

TELES, R.; et al. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. **Periodontology** 2000, v. 62, n. 1, p. 95–162, 2013.

TISCHKOWITZ, M. D.; HODGSON, S. V. Fanconi anaemia. **Journal of Medical Genetics**, v. 40, p. 1–10, 2003.

TISCHKOWITZ, M.; DOKAL, I. Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. **British Journal of Haematology**, v. 126, n. 2, p. 176–91, 2004.

TOLAR, J.; et al. Gene therapy for Fanconi anemia: one step closer to the clinic. **Human gene therapy**, v. 23, n. 2, p. 141–4, 2012.

VALE, M. J.; et al. Audiologic abnormalities of Fanconi anaemia. **Acta otolaryngologica**, v. 128, n. 9, p. 992–6, 2008.

VELAZQUEZ, I.; ALTER, B. P. Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. **American Journal of Hematology**, v. 77, n. 3, p. 257–67, 2004.

VELLEUER, E.; DIETRICH, R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. **Molecular and Cellular Pediatrics**, v. 1, n. 1, p. 9, 2014.

WALLIN, K.-L.; et al. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 101, n. 4, p. 371–374, 2002.

WANG, K.; et al. Preliminary analysis of salivary microbiome and their potential roles in oral lichen planus. **Scientific Reports**, v. 6, p. 22943, 2016.

WANG, L.; GANLY, I. The oral microbiome and oral cancer. **Clin Lab Med**, v. 34, n. 4, p. 711–719, 2014.

WINER, R.; et al. Detection of human papillomavirus in the oral cavities of persons with Fanconi anemia. **Oral Dis**, 2014.

WINGARD, J. R.; HSU, J.; HIEMENZ, J. W. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 25, n. 1, p. 101–16, 2011.

WONG, W. M.; et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in a patient with Fanconi anemia treated with radiotherapy and concurrent cetuximab: a case report and review of the literature. **Head Neck**, v. 35, n. 10, p. E292-8, 2013.

WOO, S. B.; LEE, S. J.; SCHUBERT, M. M. Graft-vs.-host disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 201–16, 1997.

YALMAN, N.; et al. The effect of bone marrow transplantation on systemic and oral health in Fanconi's aplastic anemia. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 25, n. 4, p. 329–32, 2001.

ZEEBURG, H. J. T. VAN; et al. Re: Human Papillomavirus DNA and p53 Polymorphisms in Squamous Cell Carcinomas From Fanconi Anemia Patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 12, p. 968–968, 2004.

ZEEBURG, H. J. T. VAN; et al. Clinical and Molecular Characteristics of Squamous Cell Carcinomas From Fanconi Anemia Patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 22, p. 1649–1653, 2008.

ZHENG, W.; et al. An accurate and efficient experimental approach for characterization of the complex oral microbiota. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 48, 2015.

APÊNDICE 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MAIORES DE 18 ANOS DE IDADE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Maiores de 18 anos)

Nós, Camila Pinheiro Furquim, Cassius Carvalho Torres Pereira e Flávia Rocha Fonseca Teles, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você para participar de um estudo intitulado “ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS”. Para que você possa participar é necessário que você leia este documento com atenção. Se houver palavras que você não entende, por favor, solicite todas as informações que julgar necessárias para o seu entendimento aos responsáveis pelo estudo até que você entenda tudo claramente.

Este documento serve para fornecer a você informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento sem que haja prejuízos na continuidade do seu tratamento.

O transplante de medula óssea é utilizado para o tratamento de diversos tipos de doenças do sangue. O tipo de transplante utilizado e o tratamento prévio ao transplante com quimioterapia, radioterapia e medicações que você utilizou ou utiliza podem servir de fator de risco para a rejeição do transplante (Doença do enxerto contra o hospedeiro) podendo levar a alterações na boca. Estudos têm apontado a necessidade de exame clínico rotineiro e criterioso da mucosa bucal para o diagnóstico e tratamento precoce de doenças da boca e sua transformação em câncer bucal.

- A) A sua boca necessita ser avaliada periodicamente por uma equipe odontológica, pois o tratamento da doença no sangue que você apresentava anteriormente aumenta os riscos de desenvolvimento de lesões (feridas) nesta região. Este estudo tem por objetivo examinar e realizar exames na sua boca para ajudar na identificação precoce de lesões mais agressivas. Serão coletadas saliva e raspagem da sua boca com uma escova macia para avaliar as bactérias presentes nela.
- c) Caso você participe da pesquisa, será necessário responder algumas perguntas sobre você e sua saúde e permitir um exame na sua boca. Este exame profissional será realizado da seguinte forma: Exame clínico odontológico, em ambiente com luz artificial e com o auxílio de espelho odontológico, espátula de madeira e sonda periodontal, para avaliar se há ou não presença de alterações na boca. Em seguida você irá cuspir um pouco de saliva em um pote de plástico, e será realizada uma raspagem com uma escova macia de algumas partes de sua boca, como bochecha, céu da boca e se for encontrada alguma lesão na cavidade bucal essa região também receberá a raspagem. Serão realizadas algumas fotografias de sua boca para acompanhamento das lesões. As fotografias eventualmente obtidas serão arquivadas como documentos e somente serão utilizadas para os fins desta pesquisa. Você não será identificado por meio destas fotos, que receberão um código específico. Caso seja encontrada alguma lesão suspeita, você poderá ser encaminhado para o ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal do Paraná para realizar exames complementares.

Rubricas:	
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal	_____
Pesquisador Responsável	_____
Orientador	Orientado _____

- d) Para participar da pesquisa você deverá comparecer no consultório odontológico do ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná para responder ao questionário e ser submetido a exame odontológico por aproximadamente 20 minutos.
- e) A saliva coletada e o material da raspagem serão armazenados na Universidade Federal do Paraná e após serão encaminhados para o Laboratório de uma universidade nos Estados Unidos: UNC-Chapel Hill School of Dentistry/ Koury Oral Health Sciences Building localizado na 385 S. Columbia Street Room 3406 Chapel Hill, NC 27599-7455. O laboratório não terá acesso aos seus dados pessoais, ficando apenas responsável pela análise do material encaminhado. Serão analisados quais são as bactérias presentes nessa amostra por meio da extração do DNA bacteriano. Você poderá ter acesso aos resultados obtidos após a pesquisa ter sido concluída com os pesquisadores. Quando a pesquisa terminar todas as suas amostras serão descartadas de acordo com as normas do laboratório da Universidade dos Estados Unidos (UNC-Chapel Hill School of Dentistry).
- f) O exame físico não é invasivo (o pesquisador irá apenas observar se você apresenta alguma alteração em sua boca utilizando um espelho e uma espátula de madeira), mas pode haver necessidade de um período maior do que 20 minutos de coleta de dados. Caso você autorize; serão coletados alguns dados do seu prontuário médico, como por exemplo, a data do transplante, quais as medicações que você utilizou ou utiliza (Serão utilizados códigos para que você não seja identificado pelo nome). Todos os cuidados serão tomados para evitar qualquer desconforto durante a consulta odontológica (O exame será realizado por um profissional treinado, utilizando todos os equipamentos de segurança). Caso a pesquisa traga algum prejuízo para você; fica garantido a assistência integral gratuita. Você será conscientizado sobre os benefícios da prevenção e do diagnóstico precoce do câncer de boca, visto que o tratamento tardio possui um resultado insatisfatório. Além disso, os exames podem identificar lesões em estágios iniciais de transformação. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Se você ou seus parentes tiverem alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar os pesquisadores no prédio da Odontologia do Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - Jd. Botânico, Curitiba - PR) de segunda à sexta-feira em horário comercial, ou através do telefone 041 3360-4024 para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter, e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. Você ainda pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do setor de Ciências da Saúde da UFPR, pelo telefone: 3360-7259. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científico e não científico que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.
- g) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 1219800
na data de 09/09/2015 *[assinatura]*

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável _____
Orientador _____ Orientado _____

- h) As informações relacionadas ao estudo poderão *ser* conhecidas por pessoas autorizadas; médicos. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob a forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida a confidencialidade**.
- m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Todos os gastos relacionados a pesquisa serão pagos pelo pesquisador, você não precisará se deslocar ou pagar algum procedimento.
- n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- o) Serão fornecidas duas vias desse documento que devem ser assinadas e rubricadas em todas as páginas, tanto pelo pesquisador e participante/responsável.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento ou sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo. E autorizo a utilização de dados do meu prontuário médico

(Assinatura do participante de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da FUFPR
Rua Pe. Camargo, 285 – térreo – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel. (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 1219800
na data de 09/09/2015

APÊNDICE 2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PAIS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Pais ou responsáveis)

Nós, Camila Pinheiro Furquim, Cassius Carvalho Torres Pereira e Flávia Rocha Fonseca Teles, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando seu(a)filho(a) para participar de um estudo intitulado **“ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS”**. Para que ele(a) possa participar é necessário que você leia este documento com atenção. Se houver palavras que você não entende, por favor, solicite todas as informações que julgar necessárias para o seu entendimento aos responsáveis pelo estudo até que você entenda tudo claramente.

Este documento serve para fornecer a você informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para seu(a) filho(a) participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve autorizar a participação do seu(a) filho(a) no estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou retirar seu(a)filho(a) deste estudo a qualquer momento sem que haja prejuízos na continuidade do tratamento dele(a).

O transplante de medula óssea é utilizado para o tratamento de diversos tipos de doenças do sangue. O tipo de transplante utilizado e o tratamento prévio ao transplante com quimioterapia, radioterapia e medicações que seu(a) filho(a) utilizou ou utiliza podem servir de fator de risco para a rejeição do transplante (Doença do enxerto contra o hospedeiro) podendo levar a alterações na boca. Estudos têm apontado a necessidade de exame clínico rotineiro e criterioso da mucosa bucal para o diagnóstico e tratamento precoce de doenças da boca e sua transformação em câncer bucal.

- B) A boca dele(a) necessita ser avaliada periodicamente por uma equipe odontológica, pois o tratamento da doença no sangue que ele(a) apresentava anteriormente aumenta os riscos de desenvolvimento de lesões nesta região. Este estudo tem por objetivo examinar e realizar exames na boca de seu(a) filho(a) para ajudar na identificação precoce de lesões mais agressivas. Serão coletadas saliva e raspagem da boca dele(a) com uma escova macia para avaliar as bactérias presentes nela.
- C) Caso você autorize ele(a) participar da pesquisa, será necessário responder algumas perguntas sobre ele(a) e sua saúde e permitir um exame na boca dele(a). Este exame profissional será realizado da seguinte forma: Exame clínico odontológico, em ambiente com luz artificial e com o auxílio de espelho odontológico, espátula de madeira e sonda periodontal, para avaliar se há ou não presença de alterações na boca. Em seguida ele(a) irá cuspir um pouco de saliva em um pote de plástico, e será realizada uma raspagem com uma escova macia de algumas partes da boca, como bochecha, céu da boca e se for encontrada alguma lesão na cavidade bucal essa região também receberá a raspagem. Serão realizadas algumas fotografias da boca para acompanhamento das lesões. As fotografias eventualmente obtidas serão arquivadas como documentos e somente serão utilizadas para os fins desta pesquisa. Ele(a) não será identificado por meio destas fotos, que receberão um código específico. Caso seja encontrada alguma lesão suspeita, ele(a) poderá ser encaminhado para o ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal do Paraná para realizar exames complementares.

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável _____
Orientador _____ Orientado _____

- h) Para participar da pesquisa ele(a) deverá comparecer no consultório odontológico do ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná para responder ao questionário e ser submetido a exame odontológico por aproximadamente 20 minutos.
- i) A saliva coletada e o material da raspagem serão armazenados na Universidade Federal do Paraná e após serão encaminhados para o Laboratório de uma universidade nos Estados Unidos: UNC-Chapel Hill School of Dentistry/ Koury Oral Health Sciences Building localizado na 385 S. Columbia Street Room 3406 Chapel Hill, NC 27599-7455. O laboratório não terá acesso aos dados pessoais de seu(a) filho(a), ficando apenas responsável pela análise do material encaminhado. Serão analisados quais são as bactérias presentes nessa amostra por meio da extração do DNA bacteriano. Você poderá ter acesso aos resultados obtidos após a pesquisa ter sido concluída com os pesquisadores. Quando a pesquisa terminar todas as amostras serão descartadas de acordo com as normas do laboratório da UNC-Chapel Hill School of Dentistry.
- j) O exame físico não é invasivo (o pesquisador irá apenas observar se você apresenta alguma alteração em sua boca utilizando um espelho e uma espátula de madeira), mas pode haver necessidade de um período maior do que 20 minutos de coleta de dados. Caso você autorize; serão coletados alguns dados do prontuário médico de seu filho(a), como por exemplo, a data do transplante, quais as medicações que ele(a) utilizou ou utiliza (Serão utilizados códigos para que Ele(a) não seja identificado pelo nome). Todos os cuidados serão tomados para evitar qualquer desconforto durante a consulta odontológica (O exame será realizado por um profissional treinado, utilizando todos os equipamentos de segurança). Caso a pesquisa traga algum prejuízo para você; fica garantido a assistência integral gratuita. Você será conscientizado sobre os benefícios da prevenção e do diagnóstico precoce do câncer de boca, visto que o tratamento tardio possui um resultado insatisfatório. Além disso, os exames podem identificar lesões em estágios iniciais de transformação. No entanto, nem sempre seu(a) filho(a) será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- k) Se você ou seus parentes tiverem alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar os pesquisadores no prédio da Odontologia do Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - Jd. Botânico, Curitiba - PR) de segunda à sexta-feira em horário comercial, ou através do telefone 041 3360-4024 para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter, e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. Você ainda pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do setor de Ciências da Saúde da UFPR, pelo telefone: 3360-7259. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científico e não científico que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.
- g) A participação de seu(a) filho(a) neste estudo é voluntária e se você não quiser mais que ele(a) faça parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Protocolado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em seres humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB nº 1219/2000
na data de 09/09/2015

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável _____
Orientador _____ Orientado _____

- h) As informações relacionadas ao estudo poderão *ser* conhecidas por pessoas autorizadas; médicos. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação; isto será feito sob a forma codificada, para que a **identidade de seu(a) filho(a) seja preservada e mantida a confidencialidade**.
- m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela participação dele(a) no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Todos os gastos relacionados a pesquisa serão pagos pelo pesquisador, você não precisará se deslocar ou pagar algum procedimento.
- n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome dele(a), e sim um código.
- o) Serão fornecidas duas vias desse documento que devem ser assinadas e rubricadas em todas as páginas, tanto pelo pesquisador e participante/responsável.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em que meu filho (a) participe (a). A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper a participação dele (a) a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete o seu (a) tratamento ou sem qualquer prejuízo dele (a).

Eu autorizo voluntariamente meu(a) filho(a) em participar deste estudo. E autorizo a utilização de dados do meu prontuário médico

(Assinatura do participante de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 285 – térreo – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel. (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Assinatura do Comitê de Ética em Pesquisa
do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
CEP/SD-PB.nº 1219800
Data de 09/09/2015

APÊNDICE 3 TERMO DE ASSENTIMENTO PARA ADOLESCENTES MAIORES DE 12 ANOS DE IDADE

TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (Adolescentes maiores de 12 anos menores de 18 anos).

“ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS”.

Pesquisadores: Camila Pinheiro Furquim, Cassius C. Torres-Pereira e Flávia Rocha Fonseca Teles.

Local da Pesquisa: Ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Endereço: Rua General Carneiro nº 181 - 15º andar - Tel.: (41) 3360-1007
Alto da Glória - Curitiba - PR

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao Paciente: o que é uma pesquisa?

- A) O transplante de medula óssea é utilizado para o tratamento de diversos tipos de doenças do sangue. O tipo de transplante utilizado e o tratamento prévio ao transplante com quimioterapia, radioterapia e medicações que você utilizou ou utiliza podem servir de fator de risco para a rejeição do transplante (Doença do enxerto contra o hospedeiro) podendo levar a alterações na boca. Estudos têm apontado a necessidade de exame clínico na sua boca para o diagnóstico e tratamento precoce de doenças da boca e sua transformação em câncer bucal.
- B) A sua boca necessita ser avaliada periodicamente por uma equipe odontológica, pois o tratamento da doença no sangue que você apresentava anteriormente aumenta os riscos de desenvolvimento de lesões nesta região. Este estudo tem por objetivo examinar e realizar exames na sua boca para ajudar na identificação precoce de lesões mais agressivas. Serão coletadas saliva e raspagem da sua boca com uma escova macia para avaliar as bactérias presentes nela.
- C) Caso você participe da pesquisa, será necessário responder algumas perguntas sobre você e sua saúde e permitir um exame na sua boca. Este exame profissional será realizado da seguinte forma: Exame clínico odontológico, em ambiente com luz artificial e com o auxílio de espelho odontológico, espátula de madeira e sonda periodontal, para avaliar se há ou não presença de alterações na boca. Em seguida você irá cuspir um pouco de saliva em um pote de plástico, e será realizada uma raspagem com uma escova macia de algumas partes de sua boca, como bochecha, céu da boca e se for encontrada alguma lesão na cavidade bucal essa região também receberá a raspagem.

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável _____
Orientador _____ Orientado _____

- D) Serão realizadas algumas fotografias de sua boca para acompanhamento das lesões. As fotografias eventualmente obtidas serão arquivadas como documentos e somente serão utilizadas para os fins desta pesquisa. Você não será identificado por meio destas fotos, que receberão um código específico. Caso seja encontrada alguma lesão suspeita, você poderá ser encaminhado para o ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal do Paraná para realizar exames complementares.
- E) Para participar da pesquisa você deverá comparecer no consultório odontológico do ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná para responder ao questionário e ser submetido a exame odontológico por aproximadamente 20 minutos.
- F) A saliva coletada, bem como o material da raspagem serão armazenados na Universidade Federal do Paraná e após serão encaminhados para o Laboratório de uma universidade nos Estados Unidos: UNC-Chapel Hill School of Dentistry/ Koury Oral Health Sciences Building localizado na 385 S. Columbia Street Room 3406 Chapel Hill, NC 27599-7455. O laboratório não terá acesso aos seus dados pessoais, ficando apenas responsável pela análise do material encaminhado. Serão analisados quais são as bactérias presentes nessa amostra por meio da extração do DNA bacteriano. Você poderá ter acesso aos resultados obtidos após a pesquisa ter sido concluída com os pesquisadores. Quando a pesquisa terminar todas as suas amostras serão descartadas de acordo com as normas do laboratório da UNC-Chapel Hill School of Dentistry.
- G) O exame físico não é invasivo(o pesquisador irá apenas observar se você apresenta alguma alteração em sua boca utilizando um espelho e uma espátula de madeira), mas pode haver necessidade de um período maior do que 20 minutos de coleta de dados. Caso você autorize, serão coletados alguns dados do seu prontuário médico, como por exemplo, a data do transplante, quais as medicações que você utilizou ou utiliza. Todos os cuidados serão tomados para evitar qualquer desconforto durante a consulta odontológica.(o exame será realizado por um profissional treinado com o uso de equipamentos de segurança como luvas e máscara). Você será conscientizado sobre os benefícios da prevenção e do diagnóstico precoce do câncer de boca, visto que o tratamento tardio possui um resultado insatisfatório. Além disso, os exames podem identificar lesões em estágios iniciais de transformação. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- H) Se você ou seus parentes tiverem alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar os pesquisadores no prédio da Odontologia do Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - Jd. Botânico, Curitiba - PR) de segunda à sexta-feira em horário comercial, ou através do telefone 041 3360-4024 para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter, e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. Você ainda pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do setor de Ciências da Saúde da UFPR, pelo telefone: 3360-7259. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científico e não científico que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.
- I) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Orientador _____ Orientado _____

- J) As informações relacionadas ao estudo poderão *ser* conhecidas por pessoas autorizadas; médicos. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob a forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida a confidencialidade**.
- K) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Todos os gastos relacionados a pesquisa serão pagos pelo pesquisador, você não precisará se deslocar ou pagar algum procedimento.
- L) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- M) Serão fornecidas duas vias desse documento que devem ser assinadas e rubricadas em todas as páginas, tanto pelo pesquisador e participante/responsável.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB nº 1219800
na data de 09/09/2015

Contato para dúvidas

Se você ou seus parentes tiverem alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar os pesquisadores no prédio da Odontologia do Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - Jd. Botânico, Curitiba - PR) de segunda à sexta-feira em horário comercial, ou através do telefone 041 3360-4024 para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter, e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. Você ainda pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do setor de Ciências da Saúde da UFPR, pelo telefone: 3360-7259. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. E autorizo a utilização de dados do meu prontuário médico

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

_____	_____	_____
NOME DO ADOLESCENTE	ASSINATURA	DATA

_____	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR	ASSINATURA	DATA

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 285 – térreo – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel. (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

APÊNDICE 4

QUESTIONÁRIO



*Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Odontologia - UFPR*



THE UNIVERSITY
of NORTH CAROLINA
at CHAPEL HILL

Análise da microbiota bucal de pacientes com anemia de Fanconi submetidos ao transplante de células tronco hematopoéticas

Data ___/___/___ Código :1126

QUESTIONÁRIO

Nome do paciente:

Doença base: Anemia de Fanconi

Sexo : _____ **Data nasc:** _____ **Idade:** _____ **Estado civil:** _____ **Naturalidade:** _____

Cor: () Branco () não branco **Profissão:** _____

Quantos anos você já estudou? _____ anos

- () não frequentou a escola;
() Da 1ª a 4ª série do ensino fundamental (antigo primário); (4 anos)
() Da 5ª a 8ª série do ensino fundamental (antigo ginásio); (4 anos)
() ensino médio incompleto (2º grau); (1-2 anos)
() ensino médio completo (2º Grau); (3 anos)
() ensino superior incompleto; (1-5 anos)
() ensino superior completo.; (4-x anos)
() Pós-graduação; (x anos)

Dados Familiares

Quantas pessoas moram na casa? _____ Qual é a renda mensal do grupo familiar _____

Histórico de saúde

- 1- Quando você foi diagnosticado com a doença? _____
2- Você já realizou o transplante de medula óssea () sim () não Data do TMO _____
3- Qual a sua medicação:

Histórico de saúde bucal

- 1- Fuma: () sim: Quantos cigarros por dia? _____ Há quanto tempo? _____
() não () Parou de fumar há quanto tempo? _____ () Fumou por quantos anos? _____
2- Bebe: () sim: O que você bebe: _____ Frequência: _____ Tempo: _____
() não () Parei de beber
3- Você tem uma escova só para você: () sim () não
4- Com que frequência você troca a sua escova de dente por uma nova? (PNS)
() Com menos de 3 meses () Com mais de um ano
() Entre 3 meses e menos de 6 meses () Nunca trocou
() Entre 6 meses e menos de 1 ano



**Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Odontologia - UFPR**



THE UNIVERSITY
of NORTH CAROLINA
at CHAPEL HILL

5- Quando foi ao dentista pela última vez? (PNAD) Exceto na data de hoje:

Código:1126

() Menos de 6 meses () 6 a 12 meses () 1 a 2 anos () nunca fui

6- Onde você foi ao dentista? _____

7- Você está tomando antibiótico?

() sim () não Qual? _____ Há quanto tempo? _____

8- Quando foi a última vez que você tomou antibiótico? _____

Qual o motivo? _____

9- Em qual período do dia você escova os seus dentes? () Manhã () Tarde () Noite _____

10- Suas gengivas sangram com facilidade () sim () não

Quando? () escovação () alimentação () Sangra sozinha () outro _____

Auto-relato sobre a saúde bucal

(modificado Eke et al, 2013)

1- Você acha que pode ter alguma doença na gengiva? Sim () Não () Não sei ()

2- Em geral, Como você avalia a saúde de seus dentes e gengivas? Excelente() Muito bom() Bom() Médio() Ruim ()

3- Alguma vez você já realizou algum tipo de tratamento da gengiva e dentes?

Sim () Não () Não sei () Você sabe dizer qual foi o tratamento? _____

4- Você já percebeu algum dente permanente mole? Sim () Não () Não sei informar ()

5- Você já percebeu se algum dente esta com a raiz exposta? Sim () Não () Não sei ()

6- Você sentiu dificuldade ao se alimentar, escovar devido dor ou sensibilidade nos seus dentes ou gengiva?

Sim () Não () Não sei () Quando _____

7- Durante os três últimos meses você tem notado algum problema com os seus dentes?

Sim () Não () Qual problema? _____

8- Na última semana, quantas vezes você utilizou o fio dental ou usou alguma coisa para limpar entre os seus dentes?

9- Na última semana, quantas vezes você utilizou enxaguante bucal? _____ Qual a marca? _____

Dados do prontuário médico

Origem das células: _____ **Compatibilidade:** _____

Condicionamento pré-TCTH: _____

Imunoprofilaxia: _____

Histórico de mucosite:() Sim () Não Grau _____

DECH Boca: ()sim ()não **DECH sistêmica:** () Sim () Não

Órgãos envolvidos: () pele () olhos () fígado () intestino () pulmão () outros _____

Terapia hormonal: _____

Plaquetas _____ **Neutrófilos** _____

APÊNDICE 5 FICHA CLÍNICA



*Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Odontologia - UFPR*



THE UNIVERSITY
of NORTH CAROLINA
at CHAPEL HILL

Código:1126

FICHA CLÍNICA

1- CPO-D

CPO-D= _____

17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
37	36	35	34	33	32	31	41	42	43	44	45	46	47

0	Higido
1	Cariado
2	Restaurado com cárie
3	Restaurado sem cárie
4	Perdido por cárie
5	Perdido outro motivo
6	Selante
7	Trauma
8	Não erupcionado
9	Não registrado

2- Índice de Placa Visível- (Ainamo & Bay, 1976)

16	21	24
36	41	44

0=ausência

1= presença de placa

$$IPV = \frac{\text{nº de sítios com placa}}{36} \times 100 = \text{_____} \%$$

3- Índice de sangramento gengival (Carter & Barnes, 1974)

17/16	16/15	15/14	14/13	13/12	12/11	11/21	21/22	22/23	23/24	24/25	25/26	26/27
37/36	36/35	35/34	34/33	33/32	32/31	31/41	41/42	42/23	43/44	44/45	45/46	46/47

0= ausência de sangramento

1=presença de sangramento

$$\text{Sangramento gengival} = \frac{\text{nº de sítios com sangramento}}{\text{nº total de sítios}} \times 100 = \text{_____} \%$$



Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Odontologia - UFPR



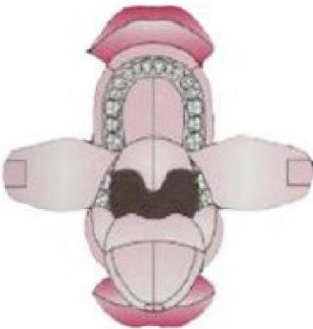
THE UNIVERSITY
of NORTH CAROLINA
at CHAPEL HILL

FICHA DO EXAMINADOR – ESTOMATOLOGIA Código: 1126

Região Mucosa

1- Lesão suspeita () sim () não

Identificação	Coleta de material	Lesão	Localização	Tamanho (mm)



ANEXO 1 TERMOS DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA BRASILEIRO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

Pesquisador: Camila Pinheiro Furquim

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 42977015.3.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.219.800

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto em sua 5ª versão, já avaliado e aprovado por este comitê, que foi encaminhado ao CONEP, por confusão de área temática na plataforma Brasil. O projeto retornou à pesquisadora com pedido de modificações no projeto, TALE, TCLE.

Objetivo da Pesquisa:

- Conhecer e quantificar a microbiota bucal de pacientes com Anemia de Fanconi durante as diversas etapas do tratamento.
- Avaliar o perfil da atividade inflamatória por meio da análise das citocinas presentes na saliva.
- Identificar os metabólitos produzidos pelas bactérias orais.
- Comparar os resultados com um grupo controle de pacientes com Anemia aplástica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"...durante a anamnese e o protocolo de fotografias, o paciente poderá se sentir constrangido, serão tomados todos os devidos cuidados para o resguardo do paciente e seus depoimentos, para que não haja prejuízos à integridade física e moral do mesmo.

Caso seja identificada alguma alteração na mucosa bucal que ofereça um risco de malignização, os pacientes e/ou responsáveis serão informados sobre essa condição e serão orientados a manterem

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.219.800

o acompanhamento clínico da lesão em suas consultas de retorno ao ambulatório. Para os pacientes menores de 18 anos essas informações serão repassadas para os pais ou responsáveis, sendo limitado ao paciente pediátrico o incentivo no cuidado com a boca. Se encontrada alguma lesão com risco de malignização, o paciente poderá ser encaminhado para o ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal do Paraná para realizar exames complementares. Serão tomados todos os cuidados necessários para evitar qualquer constrangimento ou desconforto. Os pacientes serão conscientizados sobre os benefícios da prevenção e do diagnóstico precoce do câncer bucal na diminuição da morbidade e mortalidade, visto que o tratamento tardio possui um prognóstico insatisfatório. Serão incentivados para uma prática de acompanhamento frequente, tendo em vista que o diagnóstico inicial de lesões malignas é facilitado pela topografia da cavidade bucal, o que não é possível em outros órgãos".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos estão presentes, o TALE e TCLE foram modificados conforme pedidos da CONEP

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa está de acordo a Resolução 466/2012.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -**



Continuação do Parecer: 1.219.800

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	check list 1.pdf	11/03/2015 19:40:45		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Check list 2.pdf	11/03/2015 19:41:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Encaminhamento Projeto.pdf	11/03/2015 19:42:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ATA.pdf	11/03/2015 19:43:44		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Cópia ATA.pdf	11/03/2015 19:44:05		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	analise_merito_1.pdf	11/03/2015 19:47:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Análise de mérito 2.pdf	11/03/2015 19:48:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Concordância Orientador.pdf	11/03/2015 19:48:43		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Concordância HC0001.pdf	11/03/2015 19:49:06		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Confidencialidade.pdf	11/03/2015 19:49:43		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Tornar publico resultados.pdf	11/03/2015 19:50:05		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Uso dos dados.pdf	11/03/2015 19:50:40		Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -**



Continuação do Parecer: 1.219.800

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	11/03/2015 19:58:28		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	11/03/2015 20:01:54		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Uso dos dados.pdf	11/03/2015 20:02:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Início da pesquisa.pdf	11/03/2015 20:03:43		Aceito
Outros	Declaração HC.pdf	16/03/2015 10:43:10		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO DE PESQUISA Microbiota 5.0.doc	16/03/2015 10:43:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE e TALE.docx	16/03/2015 10:44:53		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Autorização HC.pdf	16/03/2015 18:25:33		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO DE PESQUISA Microbiota 6.0 correções.doc	15/04/2015 22:33:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE e TALE atualizado.docx	15/04/2015 22:33:42		Aceito
Outros	Ata atualizado.pdf	15/04/2015 22:34:13		Aceito
Outros	autorização LAB UNC.pdf	15/04/2015 22:34:23		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Declaração Co participante.pdf	15/04/2015 22:34:40		Aceito
Outros	Declaração HC atualizada.pdf	15/04/2015 22:34:53		Aceito
Outros	Declaração HC Carmem atualizada.pdf	15/04/2015 22:35:14		Aceito
Outros	Declaração HC Samir atualizada.pdf	15/04/2015 22:35:28		Aceito
Outros	Declaração LAB UFPR.pdf	15/04/2015		Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -**



Continuação do Parecer: 1.219.800

Outros	Declaração LAB UFPR.pdf	22:35:55		Aceito
Outros	Documentos comite de ética.pdf	11/05/2015 13:34:35		Aceito
Outros	Declaration from the Co-Participant Institution Federal University of Parana Teles.pdf	11/05/2015 13:35:14		Aceito
Outros	Chair of the Committee of Ethics in Research of the Health Sciences Division at the Federal University of Parana Teles.pdf	11/05/2015 13:35:38		Aceito
Outros	June 26 2015 Declaration from Co-Participant Insitution FA project Flavia Teles.pdf	27/06/2015 22:24:54		Aceito
Outros	declaração traduzida.docx	06/07/2015 23:17:54		Aceito
Outros	Versão em DOC das autorizações.docx	06/07/2015 23:18:21		Aceito
Outros	PB_NOTA_TECNICA_1.pdf	05/08/2015 09:41:32	Letícia Calvoso Miranda	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_microbiota_correcoes.doc	25/08/2015 16:16:46	Camila Pinheiro Furquim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TALE_correcoes.docx	25/08/2015 16:18:20	Camila Pinheiro Furquim	Aceito
Outros	carta_correcoes.docx	25/08/2015 16:19:05	Camila Pinheiro Furquim	Aceito
Folha de Rosto	Folha_atualizada_25_08.pdf	25/08/2015 16:54:00	Camila Pinheiro Furquim	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_472655.pdf	25/08/2015 16:58:38		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 09 de Setembro de 2015

**Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)**

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 TERMOS DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA INTERNACIONAL

Subject: IRB Notice

To: Flavia Teles
Periodontology



THE UNIVERSITY
of NORTH CAROLINA
at CHAPEL HILL

From: Office of Human Research Ethics

Date: 11/18/2015

RE: Determination that Research or Research-Like Activity does not require IRB Approval

Study #: 15-2381

Study Title: Analysis of the Oral Microbiome of Fanconi Anemia Patients who Underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation

ANEXO 3 PANFLETO DE HIGIENE BUCAL

COMO ESCOVAR?



Observe as imagens: Na frente de todos os dentes, por dentro, em cima e embaixo.



E não esqueça de escovar a língua, pois nela também podem acumular alimentos e bactérias.

COMO USAR O FIO DENTAL?



Corte um pedaço de fio dental, enrole uma ponta em cada dedo médio. Deslize o fio entre os dentes suavemente até a gengiva. O fio deve entrar como na figura. Repita movimento em todos os dentes e faces da gengiva.



REALIZAÇÃO:
Disciplina de Estomatologia do Curso de Odontologia UFPR em parceria com o Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas UFPR.

Mais informações:
<http://www.estomatologia.ufpr.br/>



Transplante de Medula Óssea & Odontologia

VOCÊ SABIA ...

As consultas odontológicas antes e depois do transplante em pacientes que não necessitam mais de internação acontecem no ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea.



VOCÊ SABIA!

Consultas ao dentista detectam e previnem problemas como:



Cáries



Inflamações na gengiva

E COMO PREVENIR???




Alimentação saudável



Boa higiene dos dentes e da língua

MAS EU POSSO?

Posso escovar os dentes durante e logo após o transplante?
Sim. A escovação deve ser feita depois de cada refeição. Devese tomar cuidado, e realizá-la com menos força, e de preferência com uma escova macia.

Posso usar o fio dental?
O fio dental pode e deve ser usado por adolescentes e adultos antes e depois do transplante. Ele remove as bactérias e os restos de alimentos dos lugares em que a escova não alcança, ajudando a prevenir inflamação e sangramento na gengiva.

E se a gengiva sangrar?
O sangramento pode ocorrer por causa dos restos de alimentos. Se o sangramento gengival acontece por causa dos restos alimentares o uso do fio dental resolverá isso em 2 a 3 dias. Escova de dentes nova, pasta com flúor e fio dental é tudo que você precisa para evitar cárie e sangramento das gengivas.

Posso usar aparelho ortodôntico?
Pode! Desde que você esteja sem inflamação da mucosa ou gengivas e consiga fazer a limpeza dos dentes com escova, pasta de dentes e fio dental. Procure o dentista do hospital para mais informações.

Posso fazer bochecho?
Pode! O bochecho ajuda a diminuir a quantidade de bactérias na boca. O bochecho dos pacientes transplantados deve ser feito com produtos que não contenham álcool! Os bochechos NÃO substituem a escova, o fio e a pasta com flúor.

E qual pasta de dente usar?
Ela precisa ter flúor! Preferencialmente na dosagem mínima de 1000 ppm. Escolha uma marca conhecida e que seja de sabor agradável.

ANEXO 4 PANFLETO AUTOEXAME BUCAL

GUIDE-SE!

Pessoas transplantadas de medula óssea, que tem doença do enxerto contra o hospedeiro na boca e / ou tenham Anemia de Fanconi tem um **risco maior de desenvolverem câncer de boca**. Alguns cuidados diários diminuem o risco do aparecimento desta doença:

- Não fume;
- Não consuma bebidas alcoólicas;
- Proteja-se do sol com bonés, chapéus e protetores labiais com filtro solar;
- Não use enxaguantes bucais à base de álcool.

O que procurar?

- Manchas brancas;
- Manchas vermelhas;
- Inchaço, caroço ou áreas endurecidas;
- Feridas que estejam demorando para cicatrizar;
- Dificuldade para falar, mastigar ou engolir

Faça o autoexame ao menos duas vezes por ano e informe seu médico e dentista sobre qualquer alteração!




HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



PET UFPR
ODONTOLOGIA

REALIZAÇÃO:
Núcleo de Estudos em Odontologia no Transplante de Medula Óssea (NeoTMO) em parceria com Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas UFPR.

Mais informações:
<http://www.estomatologia.ufpr.br>

Autoexame Da boca



O objetivo do autoexame é fazer com que cada pessoa **identifique e aprenda como é a sua boca**. É uma técnica simples que a própria pessoa pode fazer, bastando que tenha um espelho e esteja num ambiente bem iluminado. Como o tempo ela saberá e poderá **identificar alterações que não sejam normais** e, caso necessário, procure ajuda de um profissional.

1 Observar lábios, pele e pescoço



2 Afastar lábio superior para olhar a parte de dentro do lábio e a gengiva



3 Afastar lábio inferior para olhar a parte de dentro do lábio e a gengiva



4 Afastar o lábio para ver a gengiva posterior direita



5 Afastar o lábio para ver a gengiva posterior esquerda



12 Com a boca bem aberta e o queixo para frente, enxergar o céu da boca





6 Puxar a bochecha com os dedos e enxergar a parede lateral direita



“Um bom autoexame deve durar em média 30 segundos”

11 Avaliar a parte esquerda do lado da língua



10 Avaliar a parte direita do lado da língua



9 Olhar a parte de baixo da língua



8 Olhar a parte de cima da língua



7 Puxar a bochecha e enxergar a parede lateral esquerda

